

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DE
FLAVOTIONAS**

Por
EMÍLIA PERPÉTUA TAVARES LEITÃO

**Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa para obtenção de grau de Mestre em
Bioorgânica.**

Orientador: Prof. João Carlos Lima

Monte de Caparica
2008

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. João Carlos Lima (Faculdade de Ciências e Tecnologia- Universidade nova de Lisboa) pela dedicação, orientação, disponibilidade e amizade.

A Eng.^a Lúcia Costa Pereira (Faculdade de Ciências e Tecnologia- Universidade nova de Lisboa) pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. António Maçanita (Instituto Superior Técnico) por colocar ao meu dispor o laboratório e por fornecer bibliografia relevante para a execução deste trabalho.

À Dra. Marta Borges (ASAE- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica) pelo apoio e amizade.

À Prof. Maria Manuela Pereira (Faculdade de Ciências e Tecnologia- Universidade nova de Lisboa) por se ter disponibilizado a ser minha orientadora caso fosse necessário.

À minha família pela compreensão e o apoio que me têm dado ao longo da minha vida.

SUMÁRIO

O presente trabalho descreve a síntese de 10 flavonoides e a sua caracterização espectroscópica e fotofísica, incluindo a determinação dos rendimentos quânticos de formação de tripleto e de produção de oxigénio singuleto. Os dados obtidos foram correlacionados com cálculos de orbitais moleculares de forma a racionalizar o efeito do padrão de substituição de grupo OH (hidroxilo) nas propriedades espectroscópicas e fotofísicas das flavonoides. Foi ainda estudada a fotodegradação dos compostos, isolados e identificados os fotoprodutos obtidos em diferentes meios, e proposto um mecanismo para a actuação destes compostos como fotosensibilizadores. E finalmente, utilizar este conhecimento para desenvolver pesticidas activados pela absorção de luz, mais eficientes e amigos do ambiente.

ABSTRACT

The present work describes the synthesis of 10 flavothiones and its photophysical and spectroscopic characterization, including the quantum yields, triplet formation and singlet-oxygen. The data obtained were correlated with the calculation of molecular orbitals to rationalize the effect of the standard substitution of OH (hydroxyl) group in the spectroscopic and photophysical properties of flavothiones.

The photodegradation of the compounds was also studied, the photoproducts obtained by different ways, were isolated and identified, and a mechanism for these compounds to be used as photosensitizers was proposed. And finally use all this knowledge to develop pesticides activated by light absorption, more efficient and environmental friendly.

SÍMBOLOS E NOTAÇÕES

M	Espécie atômica ou molecular
M*	Espécie excitada
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
$\sigma\sigma^*$	Transição entre orbitais moleculares sigma e sigma anti-ligante
$n\sigma^*$	Transição entre orbitais moleculares não-ligante e sigma anti-ligante
$\pi\pi^*$	Transição entre orbitais moleculares pi e pi anti-ligante
$n\pi^*$	Transição entre orbitais moleculares não-ligante e pi anti-ligante
σ	Orbital sigma
π	Orbital pi
S ₀	Estado singuleto fundamental
S ₁	Primeiro estado singuleto excitado
S ₂	Segundo estado singuleto excitado
T ₁	Primeiro estado tripleto excitado
T ₂	Segundo estado tripleto excitado
k _{nr}	Constante de velocidade do processo radiativo
k _{cis}	Constante de velocidade do cruzamento intersistemas
k _{ci}	Constante de velocidade da conversão interna
n _{S1}	Número de partículas excitadas num dado instante
τ_{S1}, τ_{fl}	Tempo de vida do estado S ₁ ; Tempo de vida de fluorescência
Φ_{fl}	Rendimento quântico de fluorescência
k _p	Constante de velocidade de fosforescência
UV-A	Região de ultravioleta A
UV-B	Região de ultravioleta B
UV-C	Região de ultravioleta C
I ₀	Luz incidente
TLC	<i>Thin layer chromatography</i> ou cromatografia em camada fina
THF	Tetrahidrofurano
DME	1,2-Dimetoxietano
δ	Desvio químico
J	Acoplamento químico
K	Kelvin
λ	Comprimento de onda

FT	Flavotona
FL	Flavona
3-OHFT	3-Hidroxiflavotona
3-OHFL	3-Hidroxiflavona
5-OHFT	5-Hidroxiflavotona
5-OHFL	5-Hidroxiflavona
6-OHFT	6-Hidroxiflavotona
6-OHFL	6-Hidroxiflavona
7-OHFT	7-Hidroxiflavotona
7-OHFL	7-Hidroxiflavona
3,6-OHFT	3,6-Dihidroxiflavotona
3,6-OHFL	3,6-Dihidroxiflavona
3,7-OHFT	3,7-Dihidroxiflavotona
3,7-OHFL	3,7-Dihidroxiflavona
5,7-OHFT	5,7-Dihidroxiflavotona
5,7-OHFL	5,7-Dihidroxiflavona
7,8-OHFT	7,8-Dihidroxiflavotona
5-MeOHFT	5-Metoxiflavotona
6-MeFT	6-Metilflavotona
6-MeOFT	6-Metoxiflavotona
f	Força do oscilador
3-MeP	3-Metilpentano
MeOH	Metanol
E_T	Energia do estado tripleto
τ_p	Tempo de vida de fosforescência
ϵ_T	Coeficiente de extinção molar
Φ_T	Rendimento quântico de formação de tripleto
ΔA	Variação de absorvância
P_{et}	Eficiência de transferência de energia
Φ_Δ	Rendimento de formação de oxigênio singuleto
ΔOD	Variação da densidade óptica
S_Δ	Probabilidade de transferência de energia de um tripleto orgânico para formar oxigênio singuleto
$^1\Delta_g$	Estado singuleto

MeCN	Acetonitrilo
EtOH	Etanol
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
^1H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de próton
^{13}C MN	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
TFEtOH	Trifluoroetanol
i-PrOH	Isopropanol
FTH $^\bullet$	Radical flavotiol

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. BREVE INTRODUÇÃO À TÉCNICA DE FOTÓLISE DE RELÂMPAGO	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Reagentes e solventes	24
3.2 Síntese das flavotionas	24
3.2.1 Flavotiona (1)	24
3.2.2 3-Hidroxiflavotiona (2)	25
3.2.3 5-Hidroxiflavotiona (3)	26
3.2.4 6-Hidroxiflavotiona (4)	26
3.2.5 7-Hidroxiflavotiona (5)	27
3.2.6 3,6-Dihidroxiflavotiona (6).....	28
3.2.7 3,7-Dihidroxiflavotiona (7).....	29
3.2.8 5,7-Dihidroxiflavotiona (crisinotiona) (8)	30
3.2.9 7,8-Dihidroxi-flavotiona (9)	30
3.2.10 5-Metoxiflavotiona (10).....	31
3.3 Identificação e caracterização química dos compostos.....	31
4. PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS	34
4.1 Espectros de Absorção	34
4.2 Efeito do solvente	35
4.3 Efeito da posição e tipo de substituinte	37
4.4 Cálculos de Orbitais Moleculares	39
4.5 Fluorescência e Fosforescência.....	41
4.6 Caracterização Fotofísica	43
5. FOTODEGRADAÇÃO	49
5.1 Fotodegradação em solução	49
5.1.1 Fotodegradação da flavotiona em etanol	49
5.1.2 Fotodegradação da flavotiona em outros alcoois	52
5.1.3 Fotodegradação da 6-OHFT	53
5.1.4 Fotodegradação da 3-OHFT e 3,6-OHFT.....	54
5.1.5 Fotodegradação da 5-OHFT e 5,7-OHFT.....	56
5.2 Fotodegradação numa matriz sólida	56

6. CONCLUSÕES	57
7. BIBLIOGRAFIA	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Sistema $C_6-C_3-C_6$.	13
Figura 2 – Via de síntese dos flavonoides.	14
Figura 3 – Níveis de energia das orbitais moleculares do formaldeído e transições possíveis.	15
Figura 4 – Diagrama de Jablónski: fenómenos electrónicos intramoleculares possíveis em moléculas excitadas.	17
Figura 5 – Representação do estado fundamental e dos estados excitados singuleto e tripleto de uma molécula.	
Figura 6 – Fenómenos possíveis em moléculas excitadas.	18
Figura 7 – Este diagrama apresenta o caminho seguido para a absorção tripleto-tripletto; a) absorção, b) cruzamento intersistemas, c) transição $T_1 \rightarrow T_2$, d) transição $T_1 \rightarrow T_n$.	23
Figura 8 – Representação gráfica da determinação da variação da absorvância em fotólise de relâmpago.	
Figura 9 – Esquema da síntese das flavotionas: o grupo carbonilo ($C=O$) é substituído pelo o grupo tionilo ($C=S$), mantendo-se inalterado o esqueleto da molécula.	24
Figura 10 – Espectros de absorção da flavona e da flavotona em metanol a 293 K.	34
Figura 11 – Espectros de absorção das flavotionas e das flavonas parentes em metanol a 293 K.	35
Figura 12 – Espectros de absorção de flavotionas em benzeno (linha contínua) e em solução aquosa a pH 14 (linha descontínua).	36
Figura 13 – Espectros de absorção da flavotona e algumas flavotionas monohidroxi-substituídas, em metanol a 293 K.	38
Figura 14 – Espectros de absorção da flavotona e algumas flavotionas dihidroxi-substituídas, em metanol.	
Figura 15 – Espectros da flavotona e algumas flavotionas substituídas na posição 6, em metanol.	39
Figura 16 – Espectros de fluorescência e fosforescência em 3-metilpentano a 298K: a) FT; b) 6-OHFT; c) 7-OHFT	41

- Figura 17** – Espectro de fosforescência em 3-metilpentano a 77K: a) FT; b) 6-OHFT; c) 7-OHFT. 42
- Figura 18** – Espectro absorção tripleto – tripleto da FT (●), 3-OHFT (▲), e 6-OHFT (◆) em benzeno ($\lambda_{exc} = 355$ nm), decaimento e cinética de recuperação da flavotona registrada a (a) 360 nm e a (b) 400 nm. 44
- Figura 19** – Supressão dos tempos de vida do tripleto da (○) FT e da (●) 3-OHFT pelo isobutanol em TFEtOH. 48
- Figura 20** – Fotodegradação da flavotona em etanol (1×10^{-4} M) em função do tempo de irradiação: a) solução arejada; b) solução desarejada a 20 °C; (1) t = 0 min, (2) t = 1 min, (3) t = 2 min, (4) t = 3 min, (5) t = 4 min, (6) t = 5 min, (7) t = 10 min e (8) t = 15 min. 50
- Figura 21** – Principais fotoprodutos da fotodegradação da flavotona em condições desarejadas. 51
- Figura 22** – Aumento da concentração da flavotona em função do tempo, numa solução desarejada em etanol com uma concentração de 1×10^{-3} M, após interrupção da irradiação. Solução mantida no escuro a 20 °C. 52
- Figura 23** – Fotodegradação da flavotona (absorvância a $\lambda = 390$ nm normalizada a t = 0) em função do tempo de irradiação em (■) isopropanol, (□) etanol, (●) trifluoroetanol e (○) metanol, desarejados a 20 °C. 53
- Figura 24** – Irradiação da solução de 6-OHFT em EtOH ($1,1 \times 10^{-4}$ M) na presença de oxigênio e a 20 °C: 1) t = 0 min, 2) t = 5 min, 3) t = 10 min, 4) t = 15 min, 5) t = 20 min, 6) t = 25 min, 7) t = 30 min, 8) t = 35 min, 9) t = 40 min, 10) t = 45 min, 11) t = 50 min, 12) t = 60 min, 13) t = 70 min. 54
- Figura 25** – Irradiação de uma solução de 3,6-OHFT em EtOH ($1,1 \times 10^{-4}$ M) na presença de oxigênio e a 20 °C. 1) t = 0 min, 2) t = 5 min, 3) t = 10 min, 4) t = 15 min, 5) t = 20 min, 6) t = 25 min, 7) t = 30 min, 8) t = 35 min, 9) t = 40 min, 10) t = 45 min, 11) t = 50 min, 12) t = 60 min, 13) t = 70 min. 55
- Figura 26** – Mecanismo de fotodegradação da flavotona na presença e na ausência de oxigênio. 56
- Figura 27** – Diagrama de energia dos dois estados excitados de menor energia, singuletos e tripletos, para os compostos dos grupos 1, 2 e 3. 57

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1-** Tempos característicos dos processos fotofísicos em moléculas orgânicas excitadas. **20**
- Tabela 2** – Deslocamentos químicos de próton observados nos espectros de RMN ^1H e pontos de fusão dos compostos sintetizados. **32**
- Tabela 3** – Comprimento de onda de absorção máxima (λ_{exp}), coeficiente de extinção molar (ϵ) e transições electrónicas calculadas por INDO/1-CI após optimização de geometria com INDO/1. **40**
- Tabela 4** – Comprimento de onda de fluorescência máxima (λ_f), rendimento quântico (Φ_f) e tempo de vida de fluorescência (τ_f) em 3-MeP, benzeno e MeOH a 293 K. Energias do estado tripleto (E_T) e tempos de vida de fosforescência (τ_p) em 3MeP e MeOH a 77 K. **43**
- Tabela 5** – Comprimento de onda (λ_{max}) de absorção tripleto-tripletto, tempos de vida de tripleto (τ_T), coeficientes de extinção molar (ϵ_T) e rendimentos quânticos de formação de tripleto (Φ_T) para as hidroxiflavotionas em benzeno, etanol (EtOH), acetonitrilo (MeCN) e trifluoroetanol (TFEtOH) a 295 K. **45**
- Tabela 6** – Rendimentos de formação de oxigénio singuleto. **47**
- Tabela 7** – Tempos de meia vida ($\tau_{1/2}$) para a fotodegradação da flavotiona, 6-OHFT, 3-OHFT e 3,6-OHFT em soluções arejadas e desarejadas em EtOH a 20 °C. **51**

1. INTRODUÇÃO

Os pesticidas resultam do esforço bem sucedido do Homem no sentido da eliminação de pragas que invadem e destroem as suas culturas. No entanto, o mundo moderno conhece já a outra face de algumas destas substâncias: são venenos perigosos para a saúde e para o meio ambiente. A ideia original deste trabalho foi a de desenvolver um pesticida activado pela absorção de luz, um pesticida revolucionário, um fotopesticida amigo do ambiente, a partir da família de compostos naturais conhecida por flavonas.

As flavonas pertencem a uma vasta família de compostos denominada por flavonoides. Flavonóide vem do latim “flavus” que quer dizer “amarelo” é um termo genérico com que se identifica uma série de metabolitos secundários das plantas ^[1]. Os flavonóide são um grupo de compostos químicos encontrados naturalmente em certas frutas, vegetais, chás, vinhos, nozes, sementes e raízes. São compostos polifenólicos com 15 átomos de carbono; dois anéis benzénicos unidos por uma cadeia linear de 3 carbonos. O esqueleto pode ser representado pelo sistema C₆-C₃-C₆ (ver Figura 1).

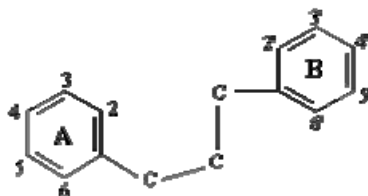


Figura 1 - Sistema C₆-C₃-C₆.

A biosíntese destes compostos envolve uma molécula de fenilalanina e 3 de malonil-CoA, através da “via biosintética dos flavonoides” (Figura 2). O esqueleto base pode sofrer posteriormente modificações e adições de grupos funcionais, dando origem a uma família muito diversa de compostos, em que os produtos finais são polifenóis geralmente solúveis em água. Os flavonoides que conservam o seu esqueleto podem classificar-se, segundo as isomerizações e os grupos funcionais que lhes são adicionados, em 6 classes principais: as chalconas, flavanonas, flavonas, flavononóis, flavonóis, flavandióis, antocianinas e os taninos condensados (as catequinas) ^[1].

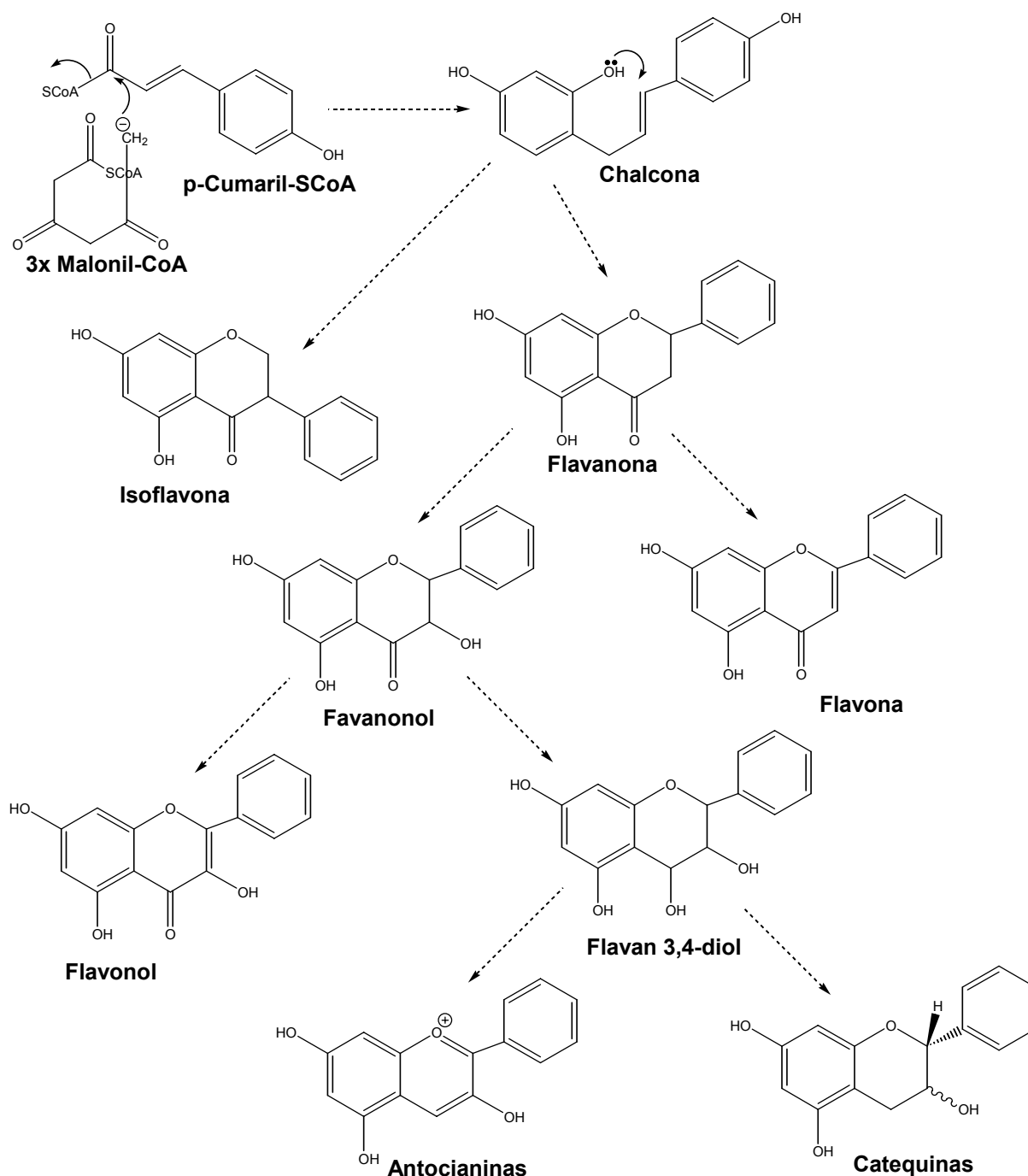


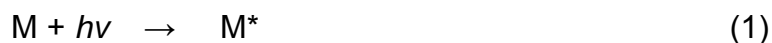
Figura 2 - Via de biosíntese dos flavonoides

Embora não sejam considerados vitaminas ^[2], têm sido descritas várias funções nutricionais para os flavonóides: a maioria actua como antioxidantes, alguns têm propriedades anti-inflamatórias, anti-microbianas, diminuem o risco de doenças cardiovasculares, são utilizados em tratamentos de cataratas hereditárias e previnem ou retardam o desenvolvimento de alguns tipos de cancro ^[3, 4, 5, 6]. É

principalmente devido às suas propriedades anti-oxidantes que os flavonoides têm sido alvo de interesse científico recente.

Não menos importante é o facto dos flavonoides serem responsáveis pela resistência das plantas à foto-oxidação e à irradiação com luz ultravioleta ^[7].

A absorção de radiação ultravioleta ou visível por uma espécie atómica ou molecular M pode ser descrito de acordo com a equação 1:



O produto da interacção entre M e um fotão $h\nu$ é uma espécie electronicamente excitada, M^* .

A absorção de radiação electromagnética na região UV-Vis envolve os electrões de valência das moléculas.

As transições electrónicas são denominadas de acordo com a orbital de origem e de destino do electrão (Figura 3), $\sigma\sigma^*$, $n\sigma^*$, $\pi\pi^*$, $n\pi^*$, etc.

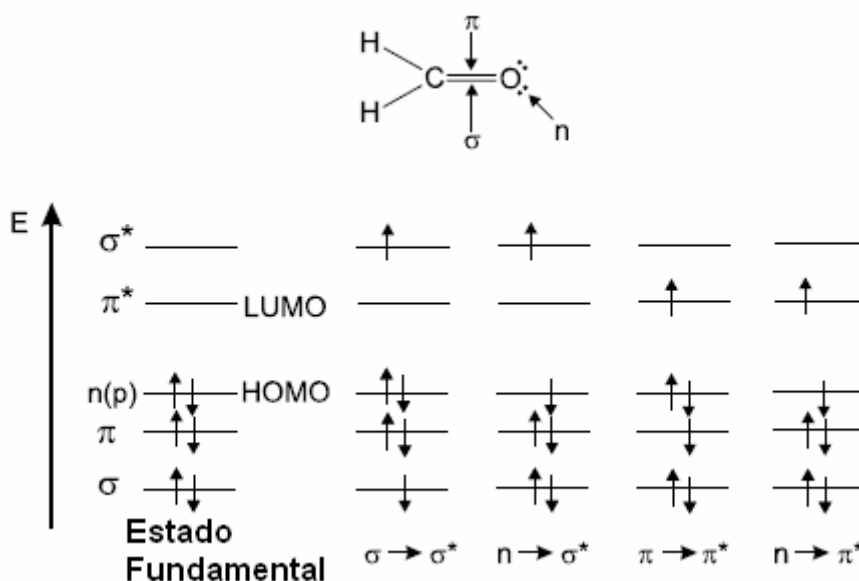


Figura 3- Níveis de energia das orbitais moleculares do formaldeído e transições possíveis.

Uma vez que as energias de excitação associadas a electrões formando a maior parte das ligações σ são altas, a absorção de radiação por estes electrões está

restrita à chamada região ultravioleta de vácuo ($\lambda < 185$ nm), onde componentes da atmosfera também absorvem energia.

A absorção de radiação visível e ultravioleta de maior comprimento de onda está associada a um número limitado de grupos funcionais (*cromóforos*) que contêm electrões de valência com energias de excitação relativamente baixas. Estes são normalmente: (1) aqueles que participam directamente na formação de ligações π , portanto associados a mais de um átomo ou (2) electrões não-ligantes (n) que estão normalmente localizados em átomos, como oxigénio, halogéneos, enxofre e azoto.

As absorptividades molares para as transições $n\pi^*$ são geralmente pequenas (10 a 100 L mol⁻¹ cm⁻¹) enquanto os valores para transições $\pi\pi^*$, por outro lado, normalmente têm absorptividades molares entre 1.000 e 10.000 L mol⁻¹ cm⁻¹. Outra característica que distingue os dois tipos de absorção é o efeito exercido pelo solvente no comprimento de onda máximo das bandas. Tipicamente as transições $n\pi^*$ desviam-se para comprimentos de onda mais curtos com o aumento da polaridade ao contrário da maioria das transições $\pi\pi^*$ que apresentam um deslocamento oposto (a acção dos solventes sobre as transições $\pi\pi^*$ não é tão regular como o observado no caso das bandas $n\pi^*$, i.e., o efeito depende da variação de momento dipolar ao passar para o estado excitado)^[8, 9, 10].

Os processos fotofísicos associados à relaxação dos estados excitados de uma molécula após absorção de luz^[11, 12] foram exaustivamente estudados no século passado durante a década de 40 e os caminhos possíveis para a desactivação do estado excitado de uma molécula orgânica foram resumidos por Aleksander Jablónski (1898-1980)^[10] (Figura 4).

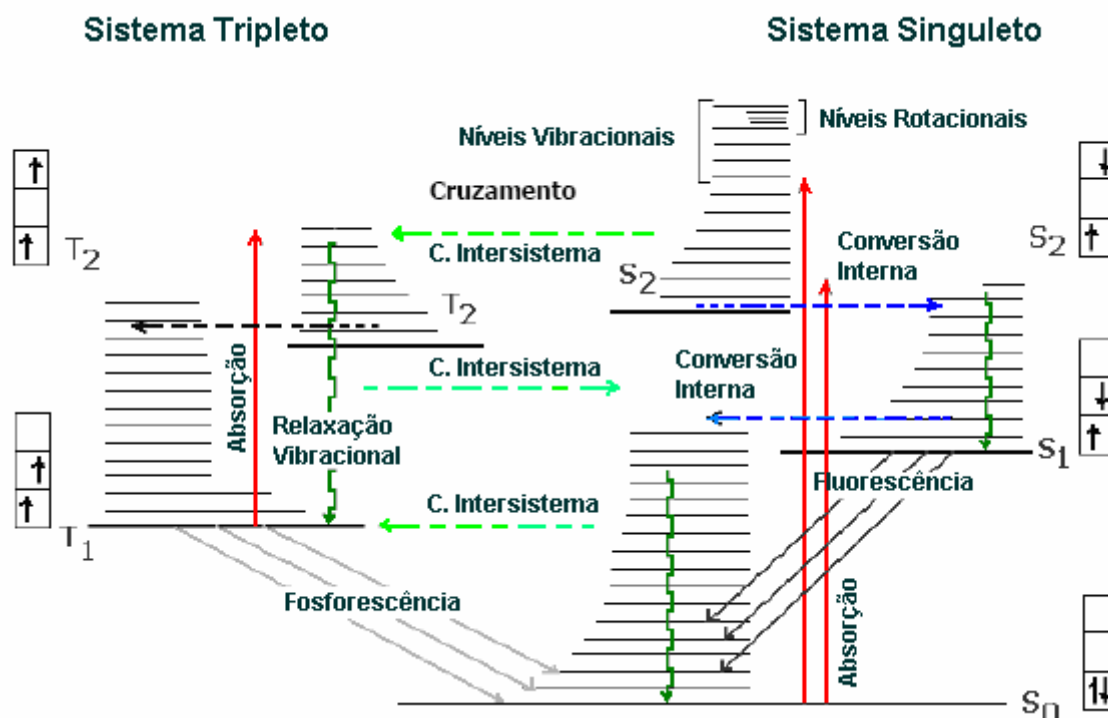


Figura 4- Diagrama de Jablónski: fenômenos eletrônicos intramoleculares possíveis em moléculas excitadas.

Uma molécula orgânica com um número par de electrões que se encontrem emparelhados no estado fundamental ($S=0$ e multiplicidade de spin $2S+1=1$, i.e., singuleto) pode apresentar dois conjuntos de estados electrónicos excitados possíveis: os que conservam o spin inicial S (singuletos) e os que sofrem alteração de spin T (tripletos) (Figura 5).



Figura 5 - Representação do estado fundamental e dos estados excitados singuleto e tripleto de uma molécula.

A cada estado electrónico, S_n ou T_n , estão obviamente associados vários estados vibracionais, mas de acordo com a distribuição estatística de Boltzmann, a grande maioria das moléculas encontra-se nos níveis vibracionais de menor energia (S_{n0} e T_{n0}) à temperatura ambiente (Figura 4).

Ao absorver um fóton a molécula passa normalmente do estado electrónico fundamental S_0 (de menor energia) para um estado excitado de maior energia (S_1 , S_2 , S_3 ,...) do mesmo spin, uma vez que a transição electrónica com alteração de spin é proibida.

Após formação do estado excitado a molécula tem ao seu dispor diversos mecanismos de desactivação para o estado fundamental (Figura 6).

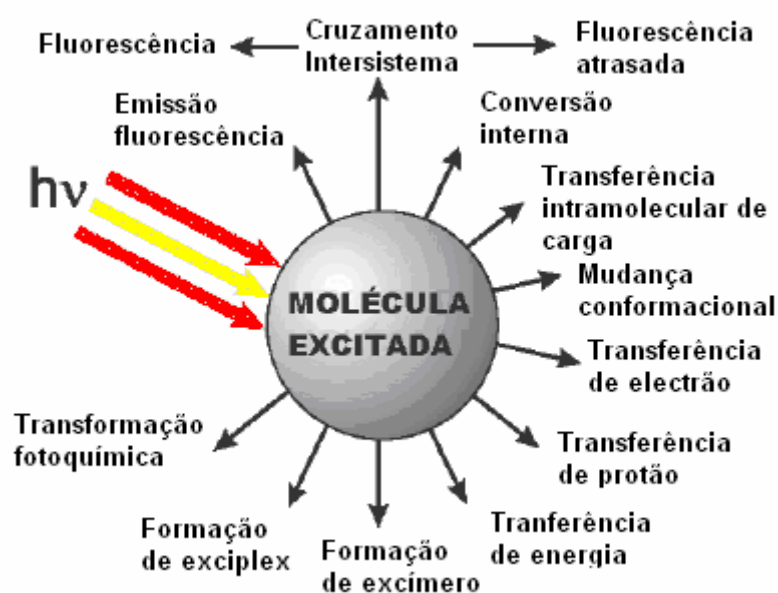


Figura 6- Fenómenos possíveis em moléculas excitadas. (Adaptado ¹⁰).

Pode relaxar por emissão de um fóton (*processo radiativo*), caracterizada pela constante de velocidade k_r . Pode atingir o estado tripleto mediante a inversão do spin de um dos electrões (*cruzamento intersistemas*), caracterizado pela constante de velocidade k_{cis} , ou por uma série de relaxações vibracionais, que leva a molécula excitada a decair através dos níveis vibracionais de estados electrónicos de igual multiplicidade, até atingir o nível vibracional do estado singuleto ou tripleto de menor energia (*conversão interna*), caracterizados pela constante de velocidade k_{ci} . Os processos que não dão origem à emissão de luz (k_{ci} e k_{cis}) são classificados como *processos não radiativos*. Devido à regra de selecção de spin, que proíbe as transições entre estados de diferente multiplicidade, normalmente a $k_{ci} \gg k_{cis}$.

A relaxação global do estado excitado S_{10} é expressa pela soma de todos os processos descritos anteriormente,

$$\frac{dn_{S1}}{dt} = - (k_r + k_{nr}) n_{S1} \quad (2)$$

Ou

$$\frac{dn_{S1}}{dt} = -k_{S1} n_{S1} = -\frac{n_{S1}}{\tau_{S1}} \quad (3)$$

sendo n_{S1} o número de partículas excitadas num dado instante, τ_{S1} o tempo de vida do estado S_{10} , também chamado tempo de vida de fluorescência, normalmente é da ordem dos nanossegundos para moléculas orgânicas em soluções líquidas. O decaimento tem uma lei exponencial relativamente à população do estado S_{10} (equação 4).

$$n_{S1}(t) = n_{S1}^0 e^{-t/\tau_{fl}} \quad (4)$$

O decaimento do estado tripleto é descrito de forma semelhante relativamente aos processos de desactivação de T_{10} . Os tempos de vida dos tripletos T_1 , para moléculas orgânicas em soluções líquidas são da ordem dos micro a milissegundos.

Pode definir-se um rendimento quântico de fluorescência (Φ_{fl}), eficiência com que a amostra emite fluorescência, através da razão entre o número de fótons emitidos e o número total de fótons absorvidos.

$$\phi_{fl} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (5)$$

O Φ_{fl} pode ser relacionado com o tempo de vida de fluorescência da seguinte forma:

$$\phi_{fl} = \frac{\tau_{S1}}{\tau_r} \quad (6)$$

Em que $\frac{1}{\tau_r} = k_r$ é a constante de velocidade radiativa acima descrita.

Pode também definir-se a eficiência de formação do estado tripleto a partir do estado singuleto como sendo a razão da constante de velocidade de cruzamento intersistemas pela soma de todos os processos que despopulam o estado S_1 .

$$\phi_T = \frac{k_{cis}}{k_r + k_{ci} + k_{cis}} \quad (7)$$

ou

$$\phi_T = \frac{\tau_{S1}}{\tau_{cis}} \quad (8)$$

Em resumo, após uma absorção $S_{00} \rightarrow S_{nv}$ (Figura 4), poderá ocorrer uma rápida relaxação vibracional não radiativa de $S_{nv} \rightarrow S_{n0}$, seguida por uma conversão interna $S_{n0} \rightarrow S_{1v}$. Neste estado pode seguir-se uma nova relaxação vibracional, $S_{1v} \rightarrow S_{10}$. No estado S_{10} as moléculas podem: relaxar de volta ao estado fundamental radiativamente (*fluorescência*) ou não-radiativamente (por conversão interna $S_{10} \rightarrow S_{0v}$ ou cruzamento intersistemas $S_{10} \rightarrow T_{nv}$). Uma vez populado o estado T_{nv} , este pode por sua vez relaxar por conversão interna até ao estado T_{10} , a partir do qual pode ocorrer desactivação radiativa ($T_{10} \rightarrow S_{00}$), com a emissão de um fóton, processo denominado *fosforescência* e caracterizado pela constante de velocidade k_p . A fluorescência é uma transição permitida por multiplicidade de spin, a emissão de fosforescência é proibida. Na Tabela 1 estão indicados os tempos característicos das transições.

Tabela 1- Tempos característicos dos processos fotofísicos em moléculas orgânicas excitadas.

Processo	Tempo
Absorção	10^{-15} s
Relaxação vibracional	10^{-12} - 10^{-10} s
Emissão a partir de S_1 (fluorescência)	10^{-10} - 10^{-7} s
Cruzamento intersistemas	10^{-10} - 10^{-8} s
Conversão interna	10^{-11} - 10^{-9} s
Emissão a partir de T_1 (fosforescência)	10^{-6} - 1 s

Uma vez que os processos proibidos por multiplicidade de spin são mais lentos, as moléculas que se encontram no estado excitado tripleto são mais susceptíveis de serem desactivadas através de processos adicionais que envolvem, por exemplo, colisões com o oxigénio molecular ou outros processos fotoquímicos (*fotodegradação*). Como o estado electrónico fundamental do oxigénio molecular é também um estado tripleto, quando estas colisões ocorrem, dá-se transferência de

energia do tripleto orgânico para o oxigénio, formando a espécie reactiva oxigénio singuleto ^[10].

Tipicamente, as flavonas, cumarinas e cromenos absorvem significativamente na região do UV-B e UV-C, e por vezes apresentam também absorção no UV-A. A maioria destes compostos tem rendimentos quânticos de formação de tripleto relativamente baixos e rendimentos quânticos de transferência de energia para formar oxigénio singuleto ainda mais baixos. No entanto, tem sido demonstrado para vários compostos desta família a existência de fotoactividade contra células e vírus, ^[13] e acredita-se que, tal como outros derivados fenólicos, são produzidos como forma de resistência das plantas a infecções por agentes patogénicos ^[14].

Becker et. al. foram os primeiros a avaliar as propriedades fotofísicas de vários compostos aparentados das flavonas e numa tentativa de aumentar a eficiência fotobiocida (normalmente envolvendo estados tripleto), a analisar o efeito provocado nessas propriedades pela substituição do grupo carbonilo por um grupo tionilo ^[15].

No presente trabalho, seguindo a mesma linha de raciocínio, sintetizaram-se várias flavotionas, para as quais se realizou também uma caracterização espectroscópica e fotofísica. O enxofre, sendo um átomo mais pesado, aumentará o acoplamento spin-órbita e provocará um aumento da eficiência de cruzamento entre sistemas. Em consequência, deve favorecer quer a formação de tripletos de longo tempo de vida quer a formação de espécies reactivas de oxigénio por sensitização a partir desses mesmos tripletos, dando origem a fotobiocidas optimizados. Uma vantagem adicional da substituição do grupo carbonilo é a de trazer para comprimentos de onda da região do visível a absorção dos fotosensibilizadores e assim aumentar a quantidade de radiação absorvida por exposição solar.

2. BREVE INTRODUÇÃO À TÉCNICA DE FOTÓLISE DE RELÂMPAGO

A fotólise de relâmpago foi desenvolvida logo após a segunda guerra mundial com o objectivo de obter câmaras fotográficas suficientemente rápidas para fotografar mísseis em pleno voo. Esta técnica foi posteriormente melhorada na década de 50 por Ronald Norrish e George Porter, demonstrando ser uma técnica extremamente útil para o estudo de espectros de absorção de espécies transientes, de estados excitados e da dinâmica da sua transformação na gama temporal dos nanosegundos a milisegundos. O princípio básico de funcionamento é o bombardeamento da amostra com um pulso curto de luz de grande intensidade, *flash* ou relâmpago, em geral utilizando um laser pulsado, a um comprimento de onda no qual a amostra absorva. Como consequência deste pulso, um número mensurável de moléculas é promovido para um estado de maior energia, estado excitado. Os processos decorrentes da formação, relaxação ou reacção destas moléculas no estado excitado dão origem a mudanças no espectro de absorção que são medidas por uma segunda fonte de luz (contínua ou pulsada) que incide sobre a amostra a 90° do pulso de excitação. O princípio básico desta técnica consiste em monitorizar a dependência temporal da absorção a vários comprimentos de onda. Desta forma determinam-se espectros, tempos de vida, rendimentos quânticos, níveis de energia e outras características de produtos com tempos de vida muito curtos, criados pela absorção de luz.

O tempo de duração do pulso é normalmente de nanosegundos para criar uma perturbação mais rápida do que os tempos de vida das espécies que se desejam medir (S_1 e T_1 , radicais livres, foto-isómeros, etc). O tempo de vida relativamente longo do estado tripleto T_1 faz com que esta técnica seja particularmente adequada para a detecção destes estados e dos espectros de absorção correspondentes às transições $T_1 \rightarrow T_n$ (Figura 7).

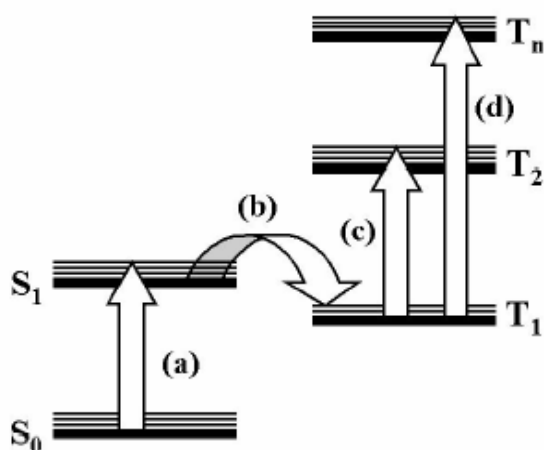


Figura 7: Este diagrama apresenta o caminho seguido para a absorção tripleto-triplete; a) absorção, b) cruzamento intersistemas, c) transição $T_1 \rightarrow T_2$, d) transição $T_1 \rightarrow T_n$.

Com o espectro de absorção do estado tripleto, pode ser estabelecida a cinética de decaimento T_1 . A determinação da variação da absorção no comprimento de onda de análise pode ser estudado considerando a radiação incidente, absorvida e transmitida (Figura 8).

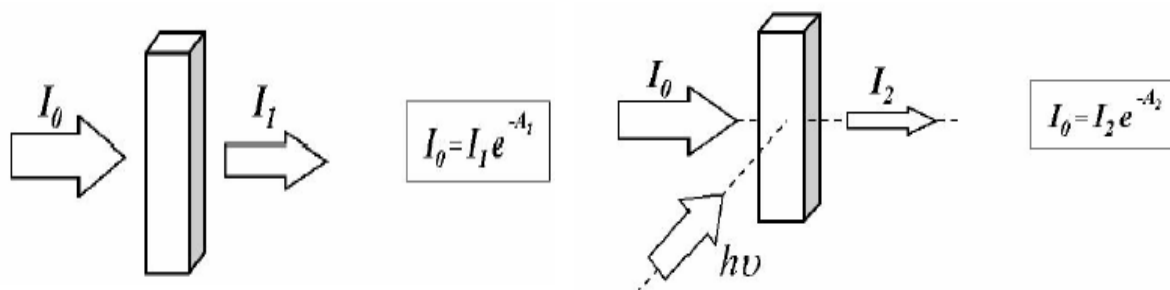


Figura 8: Representação gráfica da determinação da variação da absorvância em fotólise de relâmpago.

Quando uma luz de intensidade I_0 incide sobre uma amostra, parte da luz é absorvida (ΔA_1), e a outra parte, I_1 , é transmitida pela amostra. Na presença do pulso e excitação será observada uma alteração na absorção A_2 com a intensidade transmitida I_2 . As intensidades de absorção estão relacionadas conforme a equação:

$$\frac{I_2}{I_1} = e^{-(A_2 - A_1)} = e^{-\Delta A} \quad (9)$$

O que permite medir a variação da absorvância em função do tempo^[16, 17].

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e solventes

Na síntese das flavotionas foram utilizados reagentes e solventes comerciais (Merck, Sigma-Aldrich e Extrasynthèse) de grau de pureza superior a 90 % e empregados sem posterior purificação.

3.2 Síntese das flavotionas

As flavotionas foram sintetizadas a partir da respectiva flavona através de reacção com reagente de Lawesson's ou com pentasulfito de fósforo (Figura 9), adaptando o processo de síntese descrito anteriormente para a preparação de tio-cromonas ^[13].

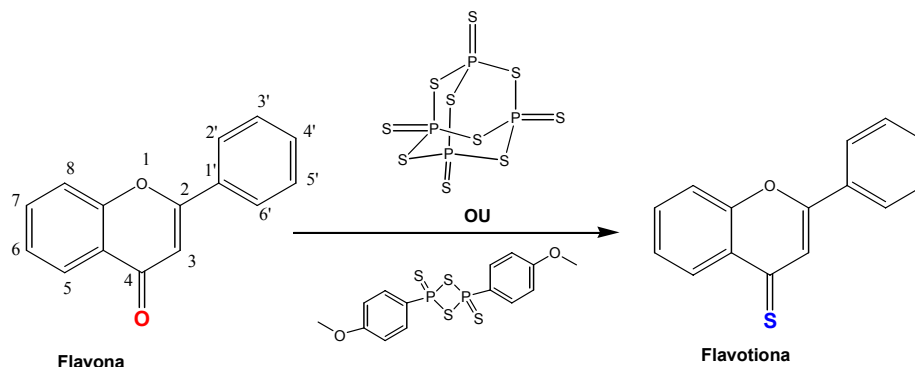


Figura 9 – Esquema da síntese das flavotionas: o grupo carbonilo (C=O) é substituído pelo o grupo tionilo (C=S), mantendo-se inalterado o esqueleto da molécula.

A evolução da reacção foi seguida por TLC (*Thin layer chromatography*) e as placas analisadas num transiluminador (254nm). Foi necessário alterar o processo de *work-up* previamente descrito para as tio-cromonas, devido às diferentes características dos compostos. Após a obtenção de cristais, estes foram mantidos no escuro a -20 °C, para evitar fotodegradação ou degradação térmica.

3.2.1 Flavotiona (1)

Num balão de 50 ml, dissolveram-se 500 mg de flavona em 25 ml de acetonitrilo. Adicionaram-se de seguida 6 eq de NaHCO₃ (bicarbonato de sódio) e 1,5 eq de P₄S₁₀. Aqueceu-se a solução a 40 °C. A mistura passou de cor-de-laranja a vermelho e após 1h ficou vermelho escuro. A reacção foi controlada por TLC usando

como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo numa proporção de 7:3. O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo numa proporção de 6:4 e como fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄, da Merck. As fracções mais puras foram combinadas e evaporadas à secura. Após avaliar a pureza do sólido, verificou-se a existência de 3 impurezas, tendo sido necessário efectuar uma nova purificação. O produto foi isolado de duas formas diferentes: por dissolução em diclorometano e precipitação com hexano e por dissolução em éter etílico e precipitação com hexano. No primeiro caso obtiveram-se cristais verdes e no segundo cristais cúbicos vermelhos. A pureza do produto foi avaliada por TLC e o rendimento em qualquer um dos casos foi de 80 % (p/p).

Numa segunda síntese, dissolveram-se 444,6 mg de flavona em 6,7 ml de DME (1,2-dimetoxietano) num balão de 25 ml. Agitou-se a solução até completa dissolução e adicionaram-se 0,53 eq de reagente de Lawesson's. A solução passou de amarela a vermelha. Após 10 minutos a reacção estava completa. Parte do solvente foi removido por evaporação. A solução foi purificada por cromatografia em coluna usando como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etilo numa proporção de 6:4 e como fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ da Merck. As fracções mais puras foram combinadas e evaporadas a secura. O resíduo foi dissolvido em metanol e precipitado com hexano. O rendimento foi de 86 % (p/p).

3.2.2 3-Hidroxiflavotona (2)

Dissolveu-se 1 g de 3-hidroxiflavona em 50 ml de acetonitrilo e 20 ml de dioxano. Agitou-se a solução durante 10 minutos e adicionaram-se 1,65 eq de P₄S₁₀. A mistura foi aquecida a uma temperatura de 80°C e mantida em refluxo durante 15 minutos. Após 1 h de reacção adicionaram-se 3,22 eq de NaHCO₃ e mantida a agitação por mais 10 minutos. O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando uma mistura de hexano e acetato de etilo numa proporção de 3:7 como fase móvel e como fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ da Merck. O sólido foi recristalizado a quente em metanol e precipitado com hexano, obtendo-se um sólido vermelho. O rendimento foi de 62 % (p/p). A pureza do produto foi avaliada por TLC.

Dissolveu-se 1 g de 3-hidroxiavona em 60 ml de THF (tetrahidrofurano) e adicionaram-se 2,52 eq de P_4S_{10} . A mistura passou de amarela a vermelha. Deixou-se a mistura reagir durante 10 minutos e adicionaram-se 8 eq $NaHCO_3$. Agitou-se a mistura durante 2 h à temperatura de 25 °C. O fim da reacção foi verificado por TLC usando como fase móvel uma mistura de acetato de etilo e hexano numa proporção de 7:3. Parte do solvente da mistura, foi removido por evaporação. Adicionou-se à solução resultante uma pequena quantidade de metanol e precipitou-se a mistura por adição de hexano. Isolou-se um sólido vermelho. A pureza do produto foi avaliada por TLC e o rendimento foi de 78 % (p/p).

3.2.3 5-Hidroxiavona (3)

Num balão de 50 ml, adicionaram-se 500 mg de 5-hidroxiavona em 30 ml de benzeno, agitou-se 5 minutos e adicionaram-se 0,8 eq de reagente de Lawesson's. A mistura foi aquecida a uma temperatura de 40°C e agitada durante 30 minutos. O fim da reacção foi verificado por TLC usando diclorometano como fase móvel. A mistura foi posteriormente arrefecida a uma temperatura entre 25 °C e 20 °C. O produto foi purificado por cromatografia em coluna. As fracções mais puras foram combinadas e concentradas à secura. Isolou-se um sólido amarelo. A pureza foi avaliada por TLC e o rendimento foi de 6 % (p/p).

3.2.4 6-Hidroxiavona (4)

Num balão de 50 ml, suspenderam-se 476,5 mg de 6-hidroxiavona numa mistura de 20 ml de acetonitrilo e 5 ml de THF. Adicionou-se 1,5 eq de P_4S_{10} . Verificou-se instantaneamente a alteração da cor da solução de amarela para laranja. Adicionou-se lentamente $NaHCO_3$ e deixou-se a reacção evoluir durante 10 minutos à temperatura de 25 °C. O controlo de reacção foi feito por TLC verificando-se o consumo do material de partida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando sílica gel 60 F₂₅₄, da Merck, como fase estacionária e uma mistura de diclorometano e metanol numa proporção de 20:1 como fase móvel. As fracções mais puras foram combinadas e o solvente foi removido por evaporação. Isolou-se um sólido vermelho. A pureza do produto foi avaliada por TLC e o rendimento foi de 21 % (p/p).

Esta reacção foi repetida com 5,29 eq de P_4S_{10} à temperatura de 80 °C. A reacção demorou 10 minutos. Verificou-se uma alteração na cor da solução de amarelo para castanho. Após 2 h adicionou-se $NaHCO_3$ e deixou-se a mistura em agitação. Como ainda havia produto de partida no ponto de aplicação que poderia ser o sal da flavotona pretendida, acidificou-se a mistura com uma solução de HCl e extraiu-se a solução com éter etílico. Concentrou-se a fase orgânica e purificou-se a solução por cromatografia em coluna usando uma mistura de hexano e acetato de etilo numa proporção de 8:2. Neste caso o rendimento foi de 37 % (p/p).

Num balão de 100 ml introduziu-se 1 g de 6-hidroxiflavona aos quais se adicionaram 65 ml de benzeno. De seguida adicionou-se 1,29 eq de reagente de Lawesson's. A mistura foi aquecida a uma temperatura de 80 °C e deixou-se reagir durante 1 h. Após esse tempo foi retirada uma amostra para controlo de reacção tendo-se verificado por TLC o consumo total do material de partida. O solvente foi removido por evaporação. A mistura foi purificada por cromatografia em coluna usando como fase estacionária sílica gel e fase móvel uma solução de hexano acetato de etilo numa proporção de 7:3. As fracções mais puras foram combinadas e evaporadas à secura. A pureza do produto foi avaliada por TLC tendo-se obtido um sólido vermelho. O rendimento foi de 30 % (p/p).

Esta reacção foi testada numa mistura de benzeno e THF a 80 °C. A reacção demorou 15 minutos. O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando como eluente hexano e acetato de etilo numa proporção de 7:3. O rendimento foi de 16,4 % (p/p). Esta reacção foi repetida com P_4S_{10} , obtendo-se um rendimento de 7 % (p/p).

3.2.5 7-Hidroxiflavotona (5)

A um balão de 50 ml adicionaram-se 460 mg de 7-hidroxiflavona e 32,2 ml de THF, e após agitação durante 5 minutos, adicionou-se 1,38 eq de reagente de Lawesson's. A mistura foi aquecida a uma temperatura de 65 °C e agitada durante 10 minutos. O fim da reacção foi verificado por TLC usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo 1:1. A mistura foi posteriormente arrefecida a uma temperatura entre 25 °C e 20 °C e mantida sob agitação até ao dia seguinte. No dia seguinte a mistura foi concentrada e o produto foi purificado por cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo numa proporção de 8:2. O produto

foi extraído da sílica com diclorometano e concentrado à secura. Isolou-se um sólido cor-de-laranja. A pureza foi avaliada por TLC e o rendimento obtido foi de 14,2 % (p/p).

Num balão de 100 ml, introduziram-se 465 mg de 7-hidroxiflavona e 60 ml de THF, previamente destilado. Adicionaram-se 2,0 eq de P_4S_{10} e após 20 minutos de agitação adicionaram-se lentamente 8,0 eq de $NaHCO_3$. A reacção foi mantida sob agitação durante 24 h em atmosfera de azoto. O controlo de reacção foi feito por TLC verificando-se o consumo do material de partida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando sílica gel 60 F_{254} , da Merck, e uma mistura de hexano e acetato de etilo numa proporção de 7:3 como eluente. As fracções mais puras foram combinadas e o solvente foi removido por evaporação. O sólido foi purificado por recristalização em metanol e hexano. Isolou-se um sólido cor-de-laranja em forma de agulhas. A pureza do produto foi avaliada por TLC. O rendimento foi de 63,4 % (p/p).

3.2.6 3,6-Dihidroxiflavotona (6)

Num balão de 50 ml introduziram-se 460 mg de 3,6-dihidroxiflavotona, 1,37 eq de reagente de Lawesson's e 17,7 ml de benzeno. A suspensão foi aquecida à temperatura de 80 °C sob agitação, tendo-se observado a dissolução completa da suspensão (amarela) após 40 minutos de refluxo, dando origem a uma solução castanho-avermelhada. O solvente foi removido por evaporação. O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura de diclorometano e metanol numa proporção de 20:1. As fracções mais puras foram combinadas e concentradas à secura. Isolou-se um sólido amarelo escuro. A pureza do produto foi avaliada por TLC. O rendimento foi de 17 % (p/p). Esta reacção também foi testada com THF e acetonitrilo. Com THF obteve-se um rendimento de 23 % (p/p) e com acetonitrilo não funcionou.

Num balão de 10 ml introduziram-se 119,7 mg de 3,6-dihidroxiflavotona, 3,6 ml de THF e 1,37 eq de reagente de Lawesson's. Após 10 minutos a reacção passou de amarelo para laranja. O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano numa proporção de 7:3. As fracções mais puras foram combinadas e concentradas à secura. Isolou-se um

sólido amarelo escuro. A pureza foi avaliada por TLC e o rendimento foi de 18,5 % (p/p).

3.2.7 3,7-Dihidroxiavotona (7)

Num balão de 50 ml introduziram-se 352,3 mg de 3,7-dihidroxiavotona, 0,7 eq de reagente de Lawesson's e 11 ml de benzeno. A solução foi aquecida à 80 °C e mantida em refluxo durante 5 minutos. Após este período de tempo, verificou-se que a solução estava demasiado espessa, adicionaram-se mais 5ml de benzeno e manteve-se o refluxo por mais 15 minutos. Verificou-se uma alteração na tonalidade da solução, tendo passado de amarela a cor de tijolo. Arrefeceu-se a mistura à temperatura ambiente e deixou-se sob agitação até ao dia seguinte. No dia seguinte retirou-se uma amostra para TLC e verificou-se que a reacção estava incompleta, por isso, adicionaram-se mais 50 mg de reagente e 15 ml de tolueno e aqueceu-se a mistura a 80 °C. A mistura manteve-se a essa temperatura durante 24 h. Após esse tempo fez-se novamente o controlo de reacção por TLC e verificou-se que a reacção estava completa. A mistura foi concentrada e purificada por cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura de diclorometano e metanol numa proporção de 8:2 e como fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ da Merck. As fracções mais puras foram combinadas e o solvente foi removido por evaporação. Isolou-se um sólido cor-de-laranja escuro. O rendimento foi de 17 % (p/p).

Dissolveram-se 260 mg de 3,7-dihidroxiavotona em 9,4 ml de acetonitrilo. Adicionou-se sob agitação 1,4 eq de P₄S₁₀ e aqueceu-se a mistura a 40 °C. Após 5 minutos a solução passou de amarela a laranja e posteriormente a vermelha. Cinco minutos depois adicionaram-se 5,7 eq de NaHCO₃. Agitou-se mais 10 minutos e fez-se o controlo de reacção por TLC verificando-se que a reacção estava completa. O solvente foi removido por evaporação e o produto foi isolado por cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura de diclorometano e metanol numa proporção de 20 para 1. As fracções mais puras foram combinadas e concentradas à secua tendo-se obtido um sólido de cor-de-laranja escuro. A pureza do produto foi avaliada por TLC. O rendimento foi de 16 % (p/p).

Esta síntese também foi testada com DME, mas os resultados não foram satisfatórios, não houve reacção.

3.2.8 5,7-Dihidroxi-flavotona (crisinotona) (8)

Num balão de 100 ml introduziram-se 1 g de 5,7-dihidroxi-flavotona e 1,37 eq de reagente de Lawesson's em 65,2 ml de THF à temperatura de 25°C, sob agitação. Ao fim de 30 minutos a reacção estava concluída. O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura de diclorometano com 5 % de metanol. As fracções puras foram combinadas e evaporadas à secura. Isolou-se um sólido amarelo. O rendimento obtido foi de 30 % (p/p). A pureza do produto foi avaliada por TLC. Esta reacção foi repetida com benzeno. Neste caso o rendimento foi ligeiramente superior, 35 % (p/p).

Num balão de 100 ml introduziram-se 2 g de 5,7-dihidroxi-flavotona e 1,67 eq de P_4S_{10} , 60 ml de benzeno e 5 ml de dietilamina. A mistura foi aquecida a 70 °C e mantida em refluxo durante 24 h. A reacção não foi completa ao fim deste período de tempo. A mistura foi purificada por cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura de diclorometano e metanol numa proporção de 20:1. As fracções puras foram combinadas e evaporadas à secura. Isolou-se um sólido amarelo. O rendimento obtido foi de 17 % (p/p).

3.2.9 7,8-Dihidroxi-flavotona (9)

Dissolveram-se 664,5 mg de 7,8-Dihidroxi-flavotona em 52,2 ml de acetonitrilo obtendo-se uma suspensão ligeiramente amarela. Agitou-se a suspensão por 5 minutos e de seguida adicionaram-se 1,5 eq de P_4S_{10} . Após 25 minutos de reacção a suspensão dissolveu-se e a cor passou de amarela a vermelha. A reacção foi controlada por TLC usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano numa proporção de 7:3. A TLC apresentava a existência de 5 produtos. O produto foi isolado por cromatografia em placa usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano numa proporção de 7:3. As fracções mais puras foram combinadas e concentradas à secura tendo-se obtido um sólido de vermelho. A pureza do produto foi avaliada por TLC. O rendimento foi de 6 % (p/p).

Esta síntese foi repetida com 1 g de 7,8-dihidroxi-flavotona em 70 ml de tolueno a temperatura 40 °C. O controlo de reacção e o isolamento foi semelhante à síntese anterior. O rendimento foi superior, 77 % (p/p).

3.2.10 5-Metoxiflavotona (10)

Dissolveram-se 460 mg de 5-metoxiflavona em 50 ml de THF obtendo-se uma solução amarela límpida. A mistura resultante foi aquecida a 50°C e posteriormente foi adicionado 1,5 eq de reagente de Lawesson's. Após 24 h e após adição de mais 500 mg de reagente, a reacção continuava incompleta, com produto de partida por reagir, e apresentava uma tonalidade azul o que poderia ser devido existência de água na mistura. A mistura foi seca com sulfato de sódio anidro e de seguida adicionaram-se mais 500 mg de reagente de Lawesson's. O produto de partida continuou intacto. Por fim adicionaram-se 500 mg de P_4S_{10} , tendo-se verificado imediatamente uma alteração na tonalidade da mistura para vermelho escuro. Passadas 24 h verificou-se que o produto de partida tinha sido consumido na totalidade. O produto foi purificado por cromatografia em coluna. Foi necessário utilizar duas colunas contendo sílica gel 60, na primeira utilizou-se como eluente uma mistura de hexano/ acetato de etilo 8:2. as fracções mais puras foram concentradas e aplicadas na segunda coluna. Nesta coluna utilizou-se como eluente uma mistura de diclorometano/ metanol 1:1. Por fim as fracções puras foram misturadas e concentradas à secura. O sólido foi recristalizado de acetato de etilo e metanol e precipitado com hexano. Obtiveram-se cristais verdes escuros em forma de agulha. A pureza foi avaliada por TLC e o rendimento foi de 29 % (p/p).

3.3 Identificação e caracterização química dos compostos

A substituição do grupo carbonilo por tionilo foi confirmada por Infra-vermelho (UNICAM Mattson 7000 FTIR) de amostras preparadas quer por deposição de um filme líquido de solução sobre pastilhas de KBr ou por dispersão do sólido em KBr. A banda intensa a ~ 1700 nm, característica do grupo C=O das flavonas, é substituída por uma banda mais larga e menos intensa a ~ 1270 - 1020 cm^{-1} , característica do grupo do C=S, para todas as flavotonas sintetizadas.

A massa dos compostos sintetizados foi confirmada por espectrometria de massa (EI, Kratos MS 25 RE) e a sua estrutura foi caracterizada por espectroscopia de ^1H NMR (Brucker AMX300) em dimetilsulfóxido deuterado.

Os pontos de fusão foram medidos num analisador de pontos de fusão Buchi 530, Apresentando transições bem definidas. Os dados da caracterização para o conjunto das flavotonas encontram-se resumidos na tabela 2.

Tabela 2 – Deslocamentos químicos de próton observados nos espectros de RMN ^1H e pontos de fusão dos compostos sintetizados.

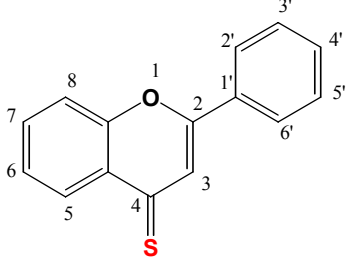
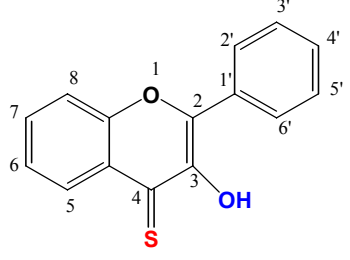
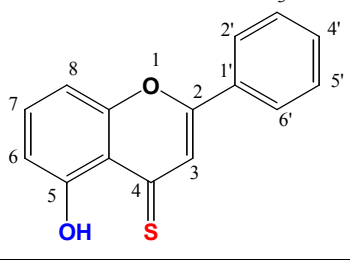
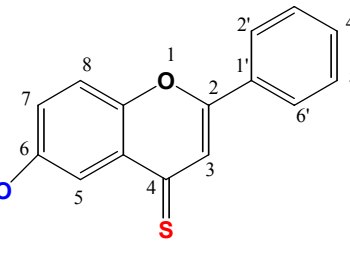
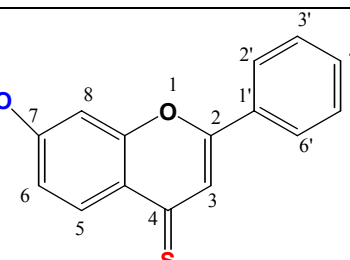
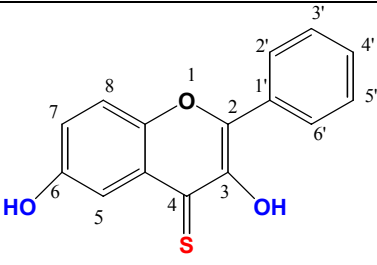
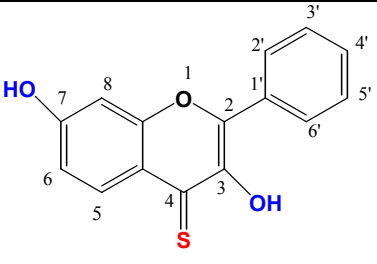
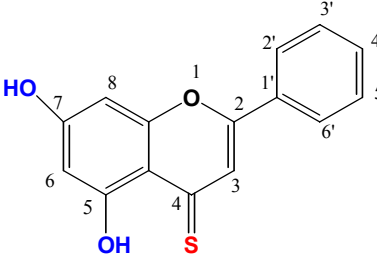
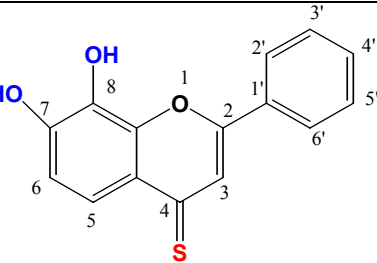
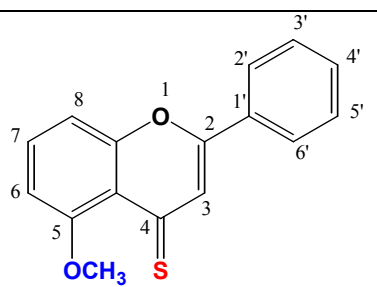
Composto	Estrutura	^1H NMR			Ponto de fusão (°C)
		Próton	δ (ppm)	J (Hz)	
1		H-5 (d) H-6', H-2' (d) H-3 (s) 2 H (m) 4 H (m)	8,45 8,23 7,95 7,90 7,59	3,0 9,0 - - -	83-85
2		H-3 (s) H-5 (d) H-2', H-6' (d) 2 H (m) 4 H (m)	9,00 8,46 8,36 7,93 7,63	- 8,7 - - -	64-68
3		H-2', H-6' (d) H-3 (s) H-5 (H do OH, s) H-3', H-4', H-5', H-7 (m) H-8 (d) H-6 (d)	8,22 7,84 13,55 7,68 7,31 6,96	6,0 - - - 9,0 6,0	130-132
4		H-2', H-6' (d) H-3 (s) H-5 (s) H-8 (s) H-3', H-4', H-5' (m) H-7 (d)	8,19 7,90 7,80 7,62 7,60 7,35	9,0 - - - - 9,0	206-208
5		H-5 (d) H-2', H-6' (d) H-3 (s) H-3', H-4', H-5' (m) H-8 (s) H-6 (d)	8,31 8,16 7,73 7,60 7,05 7,01	9,0 9,0 - - - -	191-194

Tabela 2 –(Continuação)

Composto	Estrutura	¹ H NMR			Ponto de fusão (°C)
		Protão	δ (ppm)	J (Hz)	
6		H-3 (H do OH, s) H-2', H-6' (d) H-7 (d) H-8 (s) H-3', H-4', H-5' (m) H-7 (d)	8,89 8,27 7,82 7,76 7,62 7,38	- - 6,0 - - 9,0	185-187
7		H-5 (d) H-2', H-6' (d) H-3', H-4', H-5' (m) H-6 (dd) H-8 (s)	8,44 8,33 7,52 7,02 6,96	9,0 6,6 - 2,1; 9,0 -	199-202
8		H-2', H-6' (d) H-3', H-4', H-5' (m) H-3 (s) H-8 (s) H-6 (s)	8,12 7,60 7,50 6,51 6,24	6,0 - - - -	216-218
9		H-2', H-6' (d) H-5 (d) H-3 (s) 4 H (m) H-6 (d)	8,21 7,82 7,71 7,58 7,01	6,9 8,9 - - 8,9	243-246
10		4 H (m) 5 H (m) H-8 (d) H-3 (s) H-6 (d)	8,17 7,66 7,23 7,14 6,84	- - 6,0 - 6,0	123-124

s- singuleto
d- duplete
dd- duplo duplete
m- multiplete

4. PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS

4.1 Espectros de Absorção

Os espectros de absorção UV-Vis das flavotionas (obtidos num espectrofotómetro OLYS CARY-15), estão significativamente deslocados para a região do visível, em relação aos das flavonas parentas. O efeito da substituição do oxigénio pelo enxofre é claramente ilustrado nos espectros de absorção da flavona e da flavotiona obtidos em metanol (Figura 10). A substituição do oxigénio (C=O) por enxofre (C=S) provoca um deslocamento das bandas $n\pi^*$ e $\pi\pi^*$ para comprimentos de onda maiores, devido à baixa electronegatividade do enxofre (elevada energia dos orbitais n) e à debilidade das ligações π formadas, obtendo-se orbitais π^* de baixa energia (a ligação π da C=S é formada por sobreposição da orbital 2p do carbono com a orbital 3p do S, versus a orbital 2p do oxigénio do carbonílo).

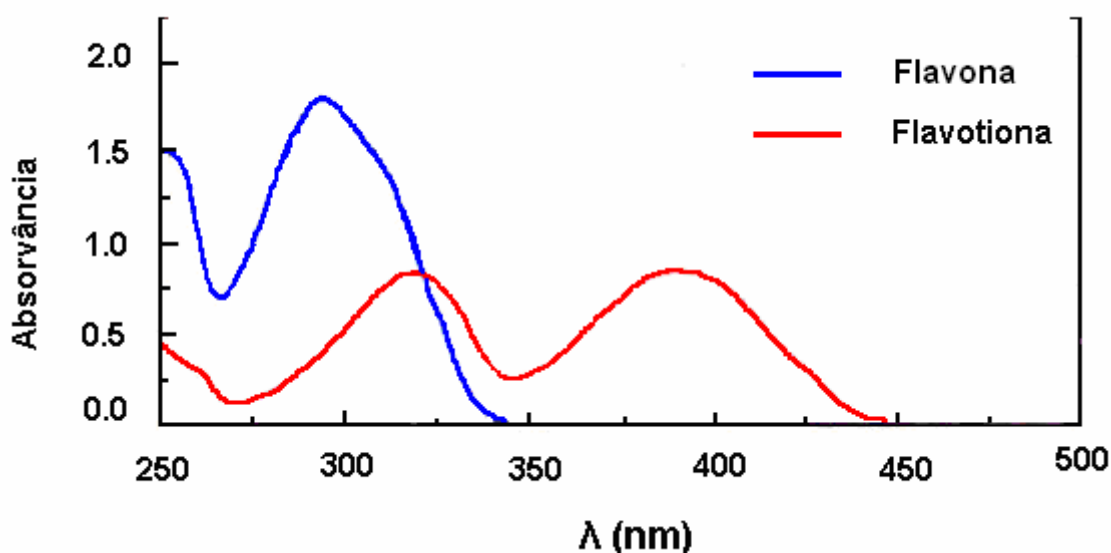


Figura 10 – Espectros de absorção da flavona e da flavotiona em metanol a 293 K.

Tal como no caso da flavotiona, os espectros de absorção UV-Vis das restantes flavotionas (3-OHFLT, 5-OHFLT, 6-OHFLT, 7-OHFLT, 3,6-OHFLT e 5,7-OHFLT) estão também deslocados para a região do visível, em relação aos espectros de absorção UV-Vis das flavonas parentas (ver Figura 11).

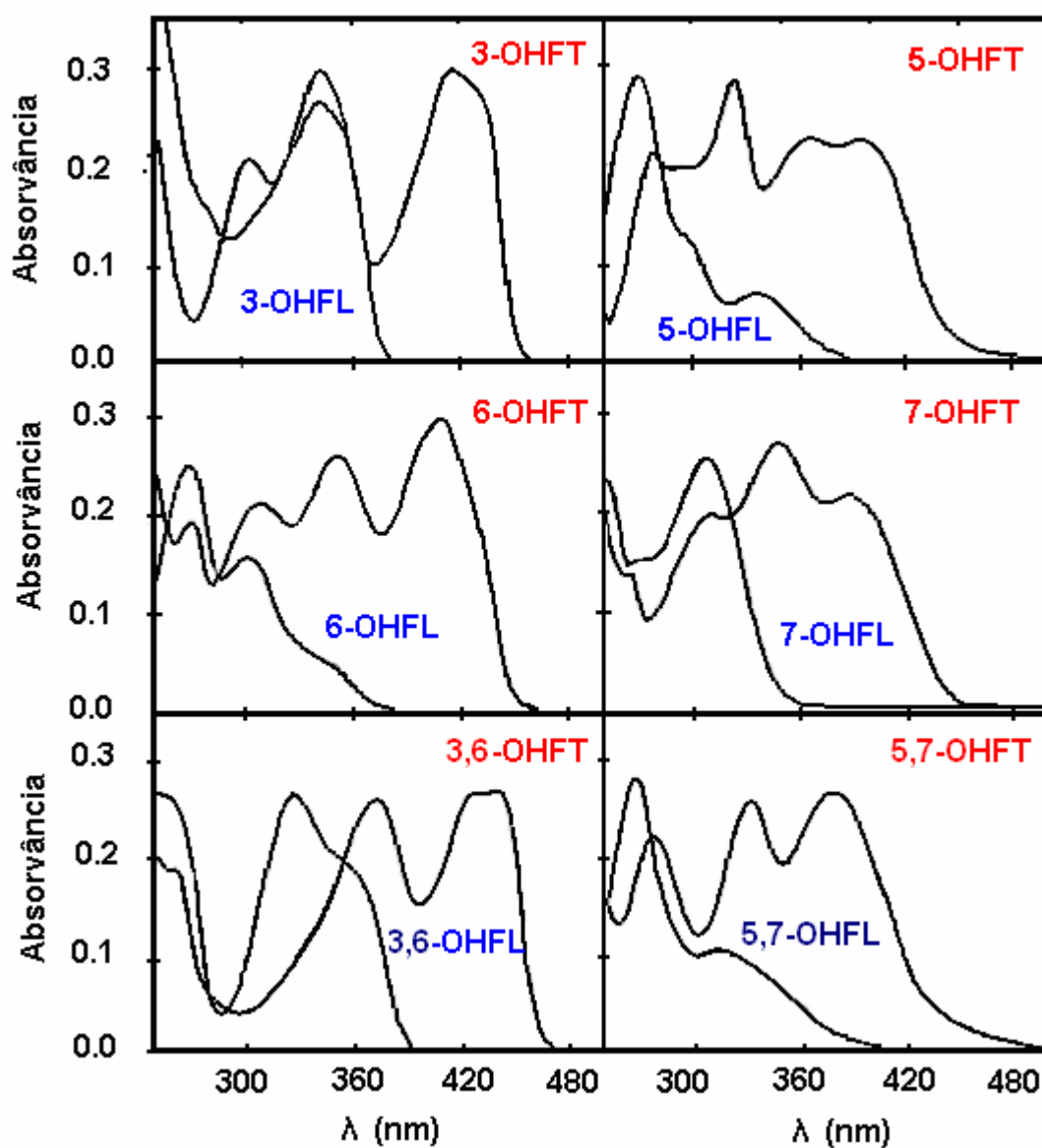


Figura 11 – Espectros de absorção das flavotonas e das flavonas parentes em metanol a 293 K.

4.2 Efeito do solvente

Na Figura 12 apresentam-se os espectros de absorção de 7 flavotonas em benzeno e em água a pH 14.

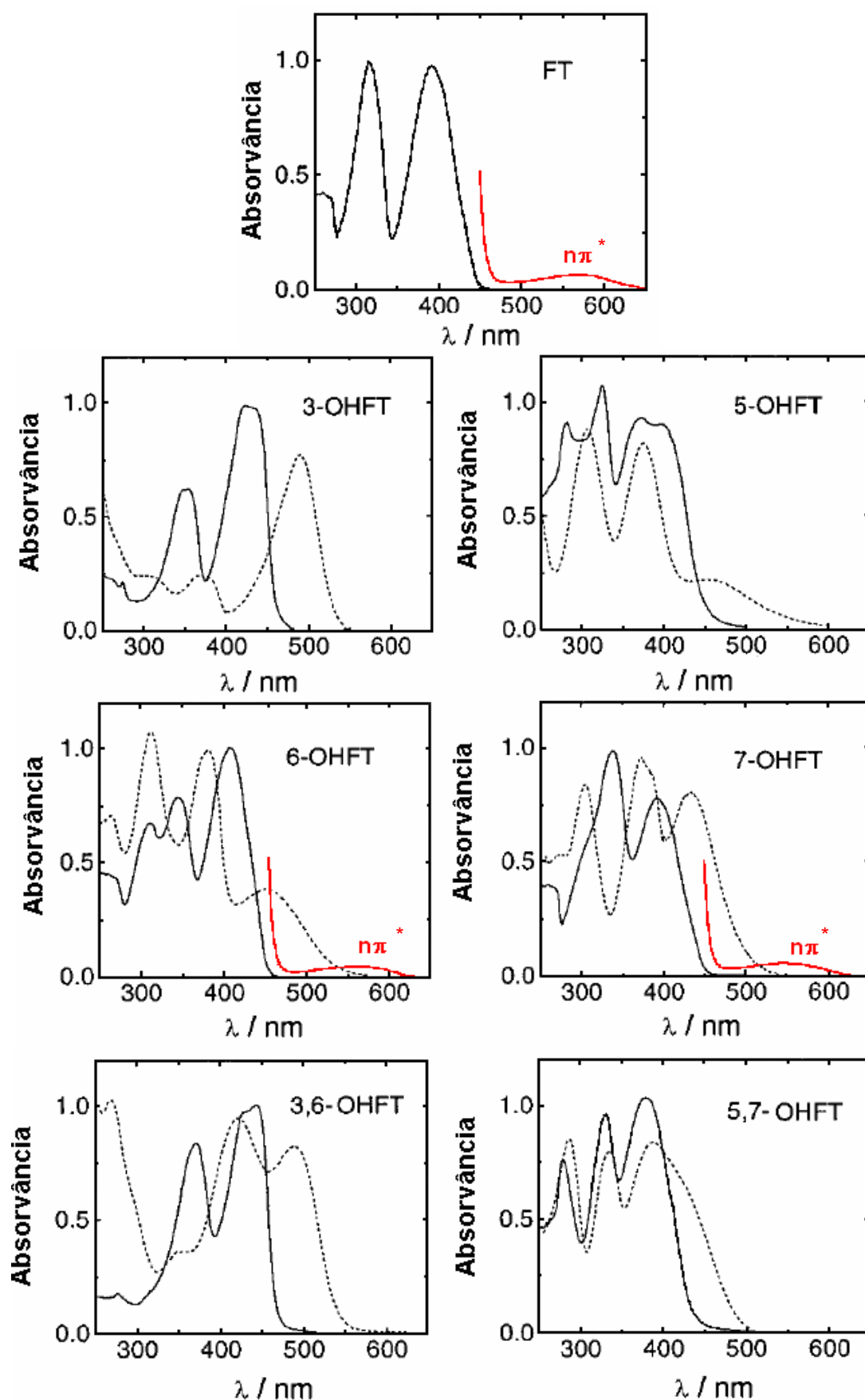


Figura 12 – Espectros de absorção de flavonoides em benzeno (linha contínua) e em solução aquosa a pH 14 (linha descontinua).

Os espectros das flavononas em solução aquosa, a pH 14, apresentam um deslocamento para o vermelho comparativamente aos espectros quer em benzeno quer em metanol, uma vez que, a este pH, ocorre a desprotonação dos hidroxilos aromáticos e o composto encontra-se maioritariamente na forma aniónica.

Os espectros em benzeno da série FT, 6-OHFT e 7-OHFT (forma neutra) apresentam uma banda adicional de muito baixa intensidade relativamente aos espectros em metanol, e que foi atribuída a uma transição $n\pi^*$. Esta banda não é visível nos espectros em metanol, porque a polaridade provoca um desvio para o azul da transição $n\pi^*$, acabando esta por ficar debaixo das bandas $\pi\pi^*$, muito mais intensas. Para a determinação rigorosa dos coeficientes de extinção molar da banda $n\pi^*$ foi necessário utilizar uma célula de quartzo de 10cm de percurso óptico. (Figura 12).

4.3 Efeito da posição e tipo de substituinte

A introdução de um grupo hidroxílico na posição 3 e 6 é particularmente eficiente na deslocação da transição $\pi\pi^*$ de mais baixa energia para comprimentos de onda maiores, tal como mostra a Figura 13, sendo o maior deslocamento verificado para a substituição na posição 3 e consequentemente no caso dos compostos dihidroxi-substituídos, o maior desvio para o vermelho verifica-se para o derivado 3,6-OHFT (Figura 14).

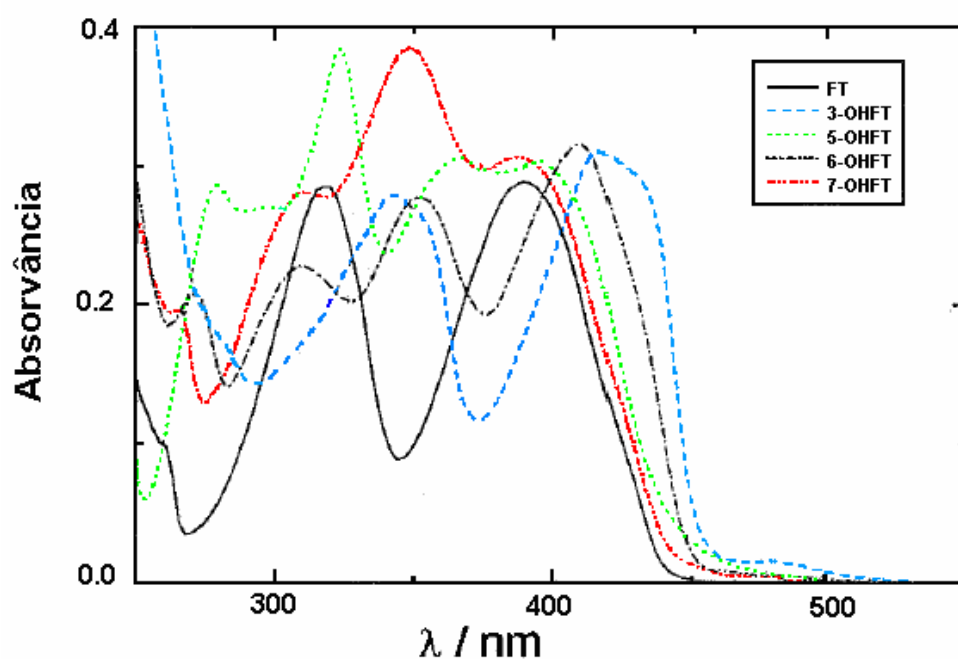


Figura 13 – Espectros de absorção da flavotona e algumas monohidroxi-substituídas, em metanol a 293 K.

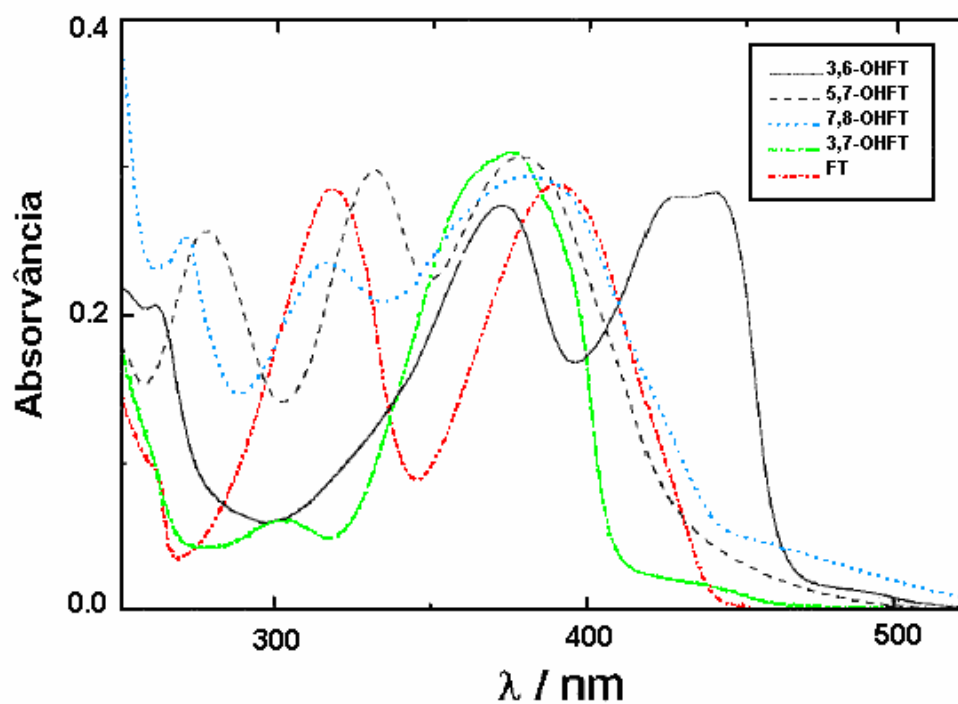


Figura 14 – Espectros de absorção da flavotona e algumas dihidroxi-substituídas, em metanol.

O tipo de substituinte afecta a posição das bandas no espectro de absorção (Figura 15), provocando os substituintes hidroxilo e metoxilo um desvio para o vermelho,

devido à participação na ressonância dos pares não ligantes do oxigénio, enquanto a substituição pelo grupo metilo induz um pequeno desvio para o azul relativamente ao composto não substituído (flavotona).

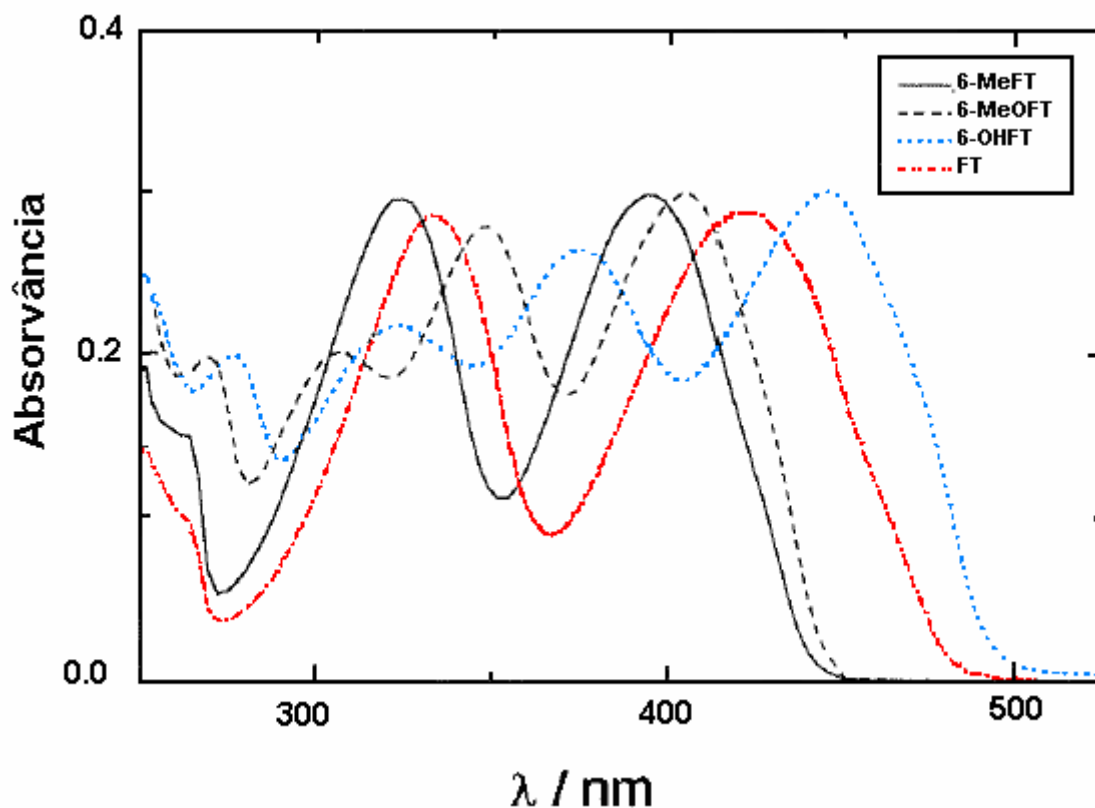


Figura 15 – Espectros da flavotona e algumas flavotonas substituídas na posição 6, em metanol^a.

4.4 Cálculos de Orbitais Moleculares

As transições electrónicas previstas para os compostos estudados através de cálculos de orbitais moleculares encontram-se resumidas na tabela 3, em conjunto com os valores obtidos experimentalmente¹⁸.

^a Os compostos 6-MeFT e 6-MeOFT foram preparados e identificados pela Dr.^a Manuela Costa (INOVA- Instituto de Inovação Tecnológica dos Açores).

Tabela 3 – Comprimento de onda de absorção máxima (λ_{exp}), coeficiente de extinção molar (ϵ) e transições electrónicas calculadas por INDO/1-CI após optimização da geometria com INDO/1 ¹⁸

Composto	Transição	λ_{exp} (nm)	ϵ ($10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{cal} (nm)	f^a	CI	
						%	Orbitais
FT	$S_0 \rightarrow S_1$	560	0,005	582	0,00004	78	$n_{H-1} \rightarrow \pi_L^{*b}$
	$S_0 \rightarrow S_2$	392	1,85	381	0,52	91	$\pi_H \rightarrow \pi_L^*$
	$S_0 \rightarrow S_3$	319	-	320	0,089	66	$\pi_H \rightarrow \pi_{L+1}^*$
	$S_0 \rightarrow S_4$	-	-	305	0,00090	81	$n_{H-1} \rightarrow \pi_{L+1}^*$
	$S_0 \rightarrow S_5$	316	1,89	298	0,45	53	$n_{H-2} \rightarrow \pi_L^*$
3_OHFT	-	-	-	-	-	22	$\pi_H \rightarrow \pi_{L+1}^*$
	$S_0 \rightarrow S_1$	-	-	574	0,00001	86	$n_{H-1} \rightarrow \pi_L^*$
	$S_0 \rightarrow S_2$	435	2,38	404	0,62	93	$\pi_H \rightarrow \pi_L^*$
	$S_0 \rightarrow S_3$	354	1,52	338	0,20	56	$n_{H-2} \rightarrow \pi_L^*$
	-	-	-	-	-	35	$\pi_H \rightarrow \pi_{L+1}^*$
5-OHFT	$S_0 \rightarrow S_4$	-	-	302	0,42	37	$\pi_H \rightarrow \pi_{L+1}^*$
	$S_0 \rightarrow S_1$	608 ^c	-	625	0,000002	77	$n_H \rightarrow \pi_L^*$
	$S_0 \rightarrow S_2$	398	1,36	372	0,53	88	$n_{H-1} \rightarrow \pi_L^*$
	$S_0 \rightarrow S_3$	326	1,54	340	0,13	74	$n_{H-2} \rightarrow \pi_L^*$
	$S_0 \rightarrow S_4$	-	-	329	0,00038	83	$n_H \rightarrow \pi_{L+1}^*$
6-OHFT	$S_0 \rightarrow S_5$	-	-	316	0,018	42	$n_{H-1} \rightarrow \pi_{L+1}^*$
	$S_0 \rightarrow S_1$	562	0,005	577	0,00001	79	$n_{H-1} \rightarrow \pi_L^*$
	$S_0 \rightarrow S_2$	409	1,80	391	0,48	90	$\pi_H \rightarrow \pi_L^*$
	$S_0 \rightarrow S_3$	345	1,42	337	0,16	43	$\pi_{H-2} \rightarrow \pi_L^*$
	-	-	-	-	-	34	$\pi_H \rightarrow \pi_{L+1}^*$
7-OHFT	$S_0 \rightarrow S_4$	311	1,18	313	0,24	35	$\pi_{H-2} \rightarrow \pi_L^*$
	-	-	-	-	-	49	$\pi_H \rightarrow \pi_{L+1}^*$
	$S_0 \rightarrow S_1$	548	0,006	569	0,00004	77	$n_{H-1} \rightarrow \pi_L^*$
	$S_0 \rightarrow S_2$	393	1,51	383	0,42	90	$\pi_H \rightarrow \pi_L^*$
	$S_0 \rightarrow S_3$	338	1,93	328	0,43	60	$\pi_{H-2} \rightarrow \pi_L^*$
3,6-OHFT	-	-	-	-	-	29	$\pi_H \rightarrow \pi_{L+1}^*$
	$S_0 \rightarrow S_4$	-	-	-	0,0013	77	$n_{H-1} \rightarrow \pi_{L+1}^*$
	$S_0 \rightarrow S_5$	300 ^d	1,00	-	0,39	26	$\pi_{H-2} \rightarrow \pi_L^*$
	-	-	-	-	-	56	$\pi_H \rightarrow \pi_{L+1}^*$
	$S_0 \rightarrow S_1$	-	-	569	0,00008	86	$n_{H-1} \rightarrow \pi_L^*$
5,7-OHFT	$S_0 \rightarrow S_2$	446	1,84	412	0,55	92	$\pi_H \rightarrow \pi_L^*$
	$S_0 \rightarrow S_3$	371	1,49	356	0,27	67	$\pi_{H-2} \rightarrow \pi_L^*$
	$S_0 \rightarrow S_4$	-	-	310	0,24	59	$\pi_H \rightarrow \pi_{L+1}^*$
	$S_0 \rightarrow S_1$	-	-	651	0,00008	77	$n_H \rightarrow \pi_L^*$
5,7-OHFT	$S_0 \rightarrow S_2$	381	1,90	378	0,44	88	$n_H \rightarrow \pi_{L+1}^*$
	$S_0 \rightarrow S_3$	332	1,77	332	0,13	52	$n_{H-2} \rightarrow \pi_{L+1}^*$
	$S_0 \rightarrow S_4$	-	-	330	0,26	44	$n_{H-2} \rightarrow \pi_L^*$

^a Força do oscilador

^b H=HOMO e L=LUMO

^c Valor obtido com a 5-metoxiflavotona

^d Ombro

Em todos os casos são previstas transições $n\pi^*$ de mais baixa energia, mas apenas em 3 casos são observadas experimentalmente (FT, 6-OHFT e 7-OHFT). Nos restantes casos as bandas $n\pi^*$ deverão estar por baixo das bandas de maior intensidade $\pi\pi^*$. Para as tornar visíveis seria necessário baixar a polaridade do solvente relativamente ao benzeno mas os problemas de solubilidade encontrados impediram posterior caracterização. As restantes transições calculadas estão em concordância com as observações experimentais no que diz respeito às energias (comprimento de onda) e intensidade (força do oscilador), se tivermos em conta que

os cálculos se referem a moléculas isoladas sem tomar em consideração o efeito do solvente.

4.5 Fluorescência e Fosforescência

Das flavononas estudadas apenas a FT, a 6-OHFT e a 7-OHFT, apresentaram luminescências detectáveis à temperatura ambiente em soluções de 3-metilpentano. Os espectros de emissão apresentam duas bandas, uma de maior energia (~500 nm) correspondente à fluorescência emitida a partir do estado S_2 (Fig.16), uma vez que S_1 é em todos os casos uma transição $n\pi^*$ proibida (não emissivo), e uma segunda banda a menores energias, ~650 nm, que apresenta resolução vibracional e corresponde à emissão de fosforescência à temperatura ambiente a partir do estado T_1 .

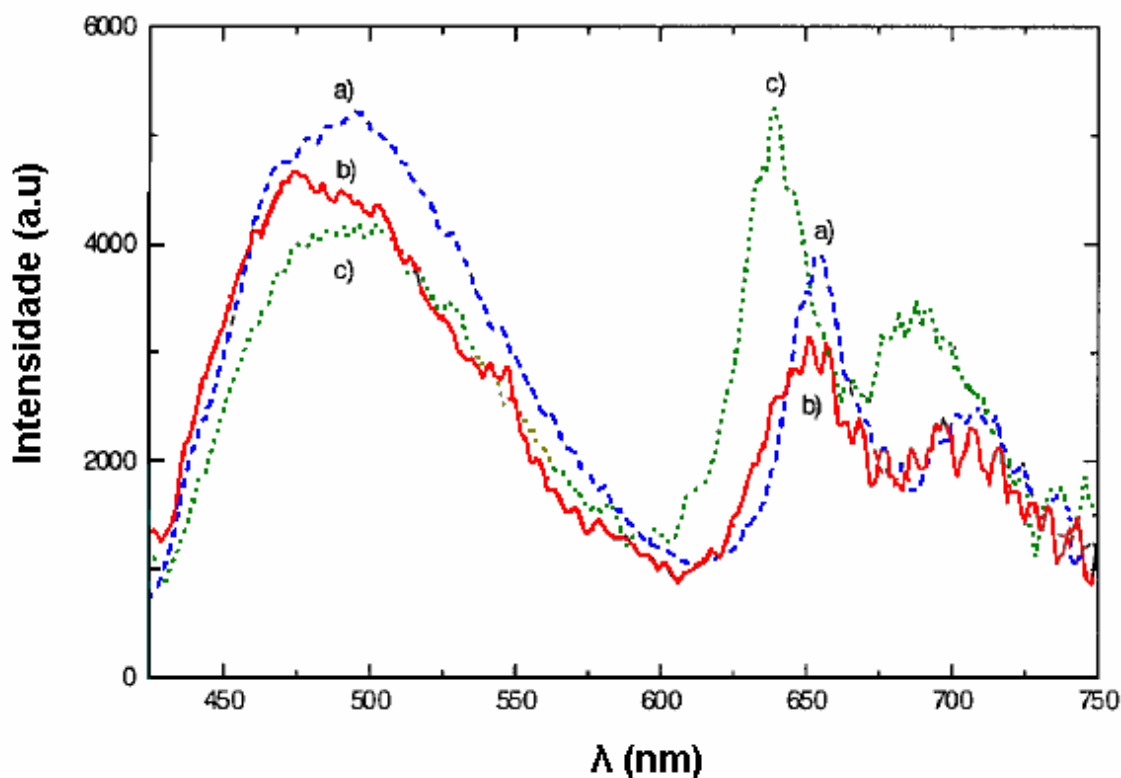


Figura 16 – Espectros de fluorescência e fosforescência em 3-metilpentano a 298 K: a) FT; b) 6-OHFT; c) 7-OHFT

Os espectros de emissão da FT, 6-OHFT e da 7-OHFT obtidos em 3-metilpentano (3-MeP) a 77 K, mostram um aumento significativo da emissão a maiores

comprimentos de onda (fosforescência), confirmando a formação significativa de tripletos nestes compostos (Figura 17).

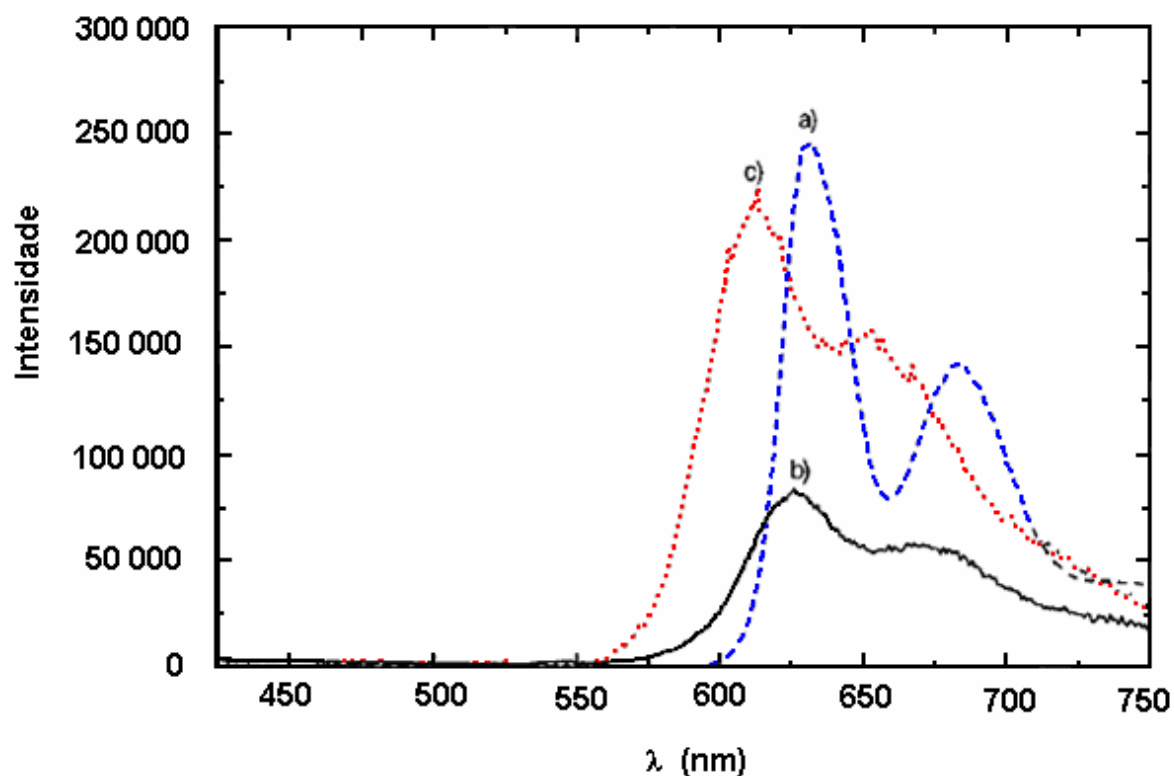


Figura 17 – Espectro de fosforescência em 3-metilpentano a 77K: a) FT; b) 6-OHFT; c) 7-OHFT.

Para os três compostos foram determinados os rendimentos quânticos e tempos de vida de fluorescência, à temperatura ambiente, e os tempos de vida de fosforescência a 77 K, em 3MeP, benzeno e metanol (MeOH), e os resultados encontram-se resumidos na Tabela 4.

Tabela 4 – Comprimento de onda de fluorescência máximo (λ_f), rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) e tempos de vida de fluorescência (τ_{fl}) em 3-MeP, benzeno e MeOH a 293 K. Energias do estado tripleto (E_T) e tempos de vida de fosforescência (τ_p) em 3MeP e MeOH a 77 K.

Composto	Solvente	λ_f (nm)	$\Phi_f (10^{-4})$	τ_{fl} (ps)	E_T (cm ⁻¹)	τ_p (μ s), 77K
FT	3-MeP	490	5,4	11	15900	59
	Benzeno	499	3,8	8,0	-	-
	MeOH	479	1,8	7,3	16200	49
6-OHFT	3-MeP	484	4,7	-	16000	82
	Benzeno	486	3,7	<3	-	-
	MeOH	470	0,8	3,9	16400	90
7-OHFT	3-MeP	496	4,4	-	15700	58
	Benzeno	490	2,5	3,6	-	-
	MeOH	480	0,6	3,4	16750	62

A tabela acima mostra que os rendimentos quânticos de fluorescência, Φ_f , são baixos ($0,6 \times 10^{-4}$ e $5,5 \times 10^{-4}$) e diminuem em solventes polares. Os decaimentos de fluorescência são mono-exponenciais com tempos de vida na ordem dos picosegundos. Os tempos de vida da 6-OHFT e da 7-OHFT são inferiores à resolução do equipamento (~ 3 ps).

4.6 Caracterização Fotofísica

A caracterização fotofísica dos compostos envolveu a determinação dos rendimentos quânticos de formação de tripleto e de produção de oxigénio singuleto utilizando o método de fotólise de relâmpago resolvida no tempo (flash fotólise).

As transições de $T_1 \rightarrow T_n$ da FT e dos seus derivados hidroxilo foram detectadas, especialmente na região dos 300-350 nm, após a excitação com pulso de “laser” e logo após o pulso (Figura 18). Os decaimentos observados para o estado tripleto de menor energia apresentam uma cinética de 1ª ordem, com uma constante observada fortemente dependente da presença de oxigénio molecular (supressão pelo oxigénio característica de um estado tripleto).

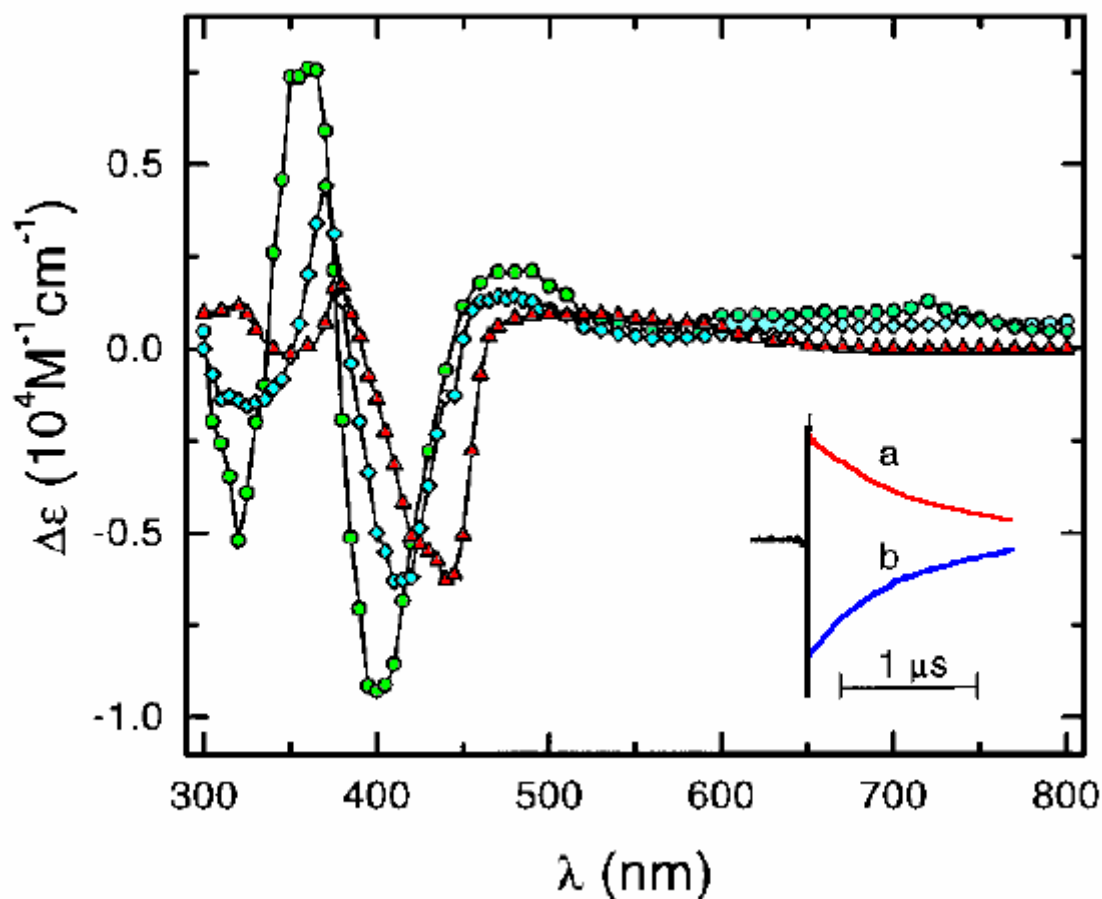


Figura 18 – Espectro absorção tripleto – tripleto da FT (●), 3-OHFT (▲), e 6-OHFT (◆) em benzeno ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$), decaimento e cinética de recuperação da flavotonia registrada a (a) 360 nm e a (b) 400 nm.

O produto $\epsilon_T \times \Phi_T$ (ϵ_T = coeficiente de extinção molar de $T_1 \rightarrow T_n$ e Φ_T = rendimento quântico de tripleto) foi medido no máximo de absorção tripleto-tripletto (300-350 nm) a tempo zero. A calibração foi feita com uma solução de benzofenona em acetonitrilo ($\epsilon_T \times \Phi_T = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹⁹ de absorvância a 355 nm idêntica à da solução de flavotonia utilizada.

Para a determinação do valor de Φ_T foi usada a absorção do tripleto do β -caroteno. O tripleto do β -caroteno foi formado (sensitizado) quer por transferência de energia a partir do substrato (flavotonia), quer por transferência de energia a partir de um composto referência de Φ_T conhecido (benzofenona, $\Phi_T(B) = 1$)²⁰. Foi usada nos dois ensaios a mesma concentração do β -caroteno e as absorvâncias a 355 nm quer da flavotonia quer da benzofenona eram idênticas²¹.

O valor de Φ_T foi calculado a partir da equação 10.

$$\phi_T = \phi_T(B) \frac{\Delta A_\beta}{\Delta A_\beta(B)} \frac{P_{et}(B)}{P_{et}} \quad (10)$$

Sendo

$$P_{et} = \frac{\tau_T - \tau'_T}{\tau_T} \quad (11)$$

Em que ΔA_β , é a variação de absorvância observada para o tripleto do β -caroteno quando sensitizado pela flavotiona e $\Delta A_\beta(B)$ é a variação de absorvância observada para o tripleto do β -caroteno quando sensitizado pela benzofenona. As eficiências de transferência de energia para o β -caroteno a partir da flavotiona, P_{et} , e da benzofenona, $P_{et}(B)$, foram obtidas por medição dos tempos de vida dos respectivos tripletos (benzofenona ou flavotiona) na ausência (τ_T) e na presença (τ'_T) do β -caroteno de acordo com a equação 11.

A Tabela 5 resume os valores obtidos para o máximo de absorção tripleto-tripletto, tempo de vida do tripleto (τ_T), rendimento quântico de formação de tripleto (Φ_T) em benzeno, acetonitrilo, etanol e TFEtOH, para os diferentes compostos estudados.

Tabela 5 – Comprimento de onda (λ_{\max}) de absorção tripleto-tripletto, tempos de vida de tripleto (τ_T), coeficientes de extinção molar (ϵ_T) e rendimentos quânticos de formação de tripleto (Φ_T) para as hidroxiflavotionas em benzeno, etanol (EtOH), acetonitrilo (MeCN) e trifluoroetanol (TFEtOH) a 295 K.

Composto	Solvente	λ_{\max} (nm)	τ_T (μ s)	ϵ_T^a ($M^{-1} cm^{-1}$)	Φ_T	Φ_T^b
FT	Benzeno	360, 480	0,93	7600	1,0	
	EtOH	355, 480	0,04	7450 ^c	0,90	1,0
	MeCN	350, 490	0,31	7300	0,93	1,0
	TFEtOH	355, 480	0,70	7450 ^c	0,95	-
3-OHFT	Benzeno	320, 380, 520	7,1	1700	1,0	-
	EtOH	370, 480	5,9	2350 ^d	-	0,95
	MeCN	370, 480	3,6	3500 ^d	-	0,89
	TFEtOH	370, 510	6,3	3400 ^d	-	1,0

Tabela 5 – (continuação)

Composto	Solvente	λ_{\max} (nm)	τ_T (μ s)	ϵ_T^a ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Φ_T	Φ_T^b
6-OHFT	Benzeno	<u>370</u> , 480, 750	1,6	4400	0,96	-
	EtOH	<u>350</u> , 465, 670	0,10	4800 ^d	-	0,85
	MeCN	<u>365</u> , 470	0,63	4700 ^d	-	0,87
	TFEtOH	470	0,91	1050 ^d	-	0,83
7-OHFT	Benzeno	<u>380</u> , 505, 710	1,1	3800	0,98	-
	EtOH	^e	0,08	-	-	0,91
	MeCN	<u>370</u> , 505	0,38	3900 ^d	-	0,73
	TFEtOH	515	0,45	1400 ^d	-	0,70
3,6-OHFT	Benzeno	<u>325</u> , 395, 480, 570	12,0	1250	0,96	-
	EtOH	<u>300</u> , 480, 580	9,1	750 ^d	-	0,93
	MeCN	<u>470</u> , 570	7,1	1540 ^d	-	1,0
	TFEtOH	<u>490</u> , 560	8,1	2500 ^d	-	0,95

^a Coeficiente de extinção obtido no comprimento de onda máximo sublinhado

^b valor obtido a partir do rendimento quântico de oxigênio singuleto assumindo que S_Δ medido em benzeno

^c Valor médio em benzeno e acetonitrilo

^d Valor obtido da razão do $(C_T \times \Phi_T / \Phi_T)$

^e A absorção tripleto-tripletto está escondida pela absorção do fotoproducto e pela recuperação do estado fundamental

Não foi possível medir por transferência de energia o Φ_T do 5-OHFT e do 5,7-OHFT. Em solventes polares, devido à baixa solubilidade do β -caroteno, foi necessário recorrer ao rendimento de formação de oxigênio singuleto (Φ_Δ) em soluções arejadas, usando o valor $(S_\Delta)_{\text{benz}} = (\Phi_\Delta / \Phi_T)_{\text{benz}} \approx 0,6$ medido em benzeno e os tempos τ_T e τ_T' correspondentes ao tempo de vida do tripleto em solução desarejada e arejada, respectivamente (equação 12). Os rendimentos de formação de oxigênio singuleto (Φ_Δ) foram determinados medindo a intensidade de fosforescência do O_2 ($^1\Delta_g$) com um detector de germânio em soluções arejadas²². O Φ_Δ foi obtido do ΔOD a tempo zero usando como referência a fenalenona ($\Phi_\Delta = 0,97 \pm 0,03$)²³, equação 12.

$$(\phi_T)_{EtOH} = \frac{(\phi_\Delta)_{EtOH}}{(S_\Delta)_{benz}} \left(\frac{\tau_T}{\tau_T - \tau_T'} \right)_{EtOH} \left(\frac{\tau_T - \tau_T'}{\tau_T} \right)_{benz} \quad (12)$$

Os rendimentos de formação do oxigénio singuleto (Φ_Δ), obtidos para diferentes solventes, são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Rendimentos de formação de oxigénio singuleto, Φ_Δ

Φ_Δ				
Composto	Benzeno	MeCN	TFEtOH	EtOH
FT	0,64	0,44	0,44	0,14
3-OHFT	0,59	0,62	0,62	0,56
5-OHFT	0,04 s	<0,01	<0,01	<0,01
6-OHFT	0,61	0,48	0,48	0,15
7-OHFT	0,59	0,30	0,30	0,11
3,6-OHFT	0,61	0,57	0,57	0,56
5,7-OHFT	0,05	<0,01	<0,01	<0,01

Os rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto, Φ_Δ , em benzeno são semelhantes em todos os derivados hidroxílicos (aproximadamente 0,6), excepto nos casos dos compostos 5-OHFT e 5,7-OHFT, onde também não se observa a formação de tripleto e consequentemente a formação de oxigénio singuleto é residual.

No caso dos compostos 3-OHFT e 3,6-OHFT os valores de Φ_Δ não dependem do solvente utilizado, enquanto no caso da FT, 6-OHFT e 7-OHFT se observa uma redução drástica da eficiência de formação de oxigénio singuleto em etanol. Como nestes compostos o rendimento quântico de formação de tripleto em etanol não é significativamente diferente do observado para os outros solventes, esta redução na formação de oxigénio singuleto deverá estar associada a uma reacção, que envolvendo estes tripletos em etanol, compete com a formação de oxigénio singuleto.

Experiências de supressão do estado de tripleto da FT e 3-OHFT foram feitas medindo o efeito nos tempos de vida em TFEtOH com a adição progressiva de

isobutanol. No caso da 3-OHFT a adição de isobutanol não afecta o tempo de vida enquanto no caso da FT uma diminuição drástica do tempo de vida do tripleto é observada (aumento de $\tau_0/\tau-1$, em que τ_0 é o tempo na ausência de isobutanol e τ é o tempo na presença de isobutanol). É conhecido que os tripletos de natureza $n\pi^*$ têm tendência a reagir por abstracção de átomos de hidrogénio lábeis, como é o caso do hidrogénio ligado ao carbono terciário do isobutanol ²⁴. O efeito de supressão observado, que se deve à reacção de abstracção de átomo de H pelo tripleto da FT, identifica claramente a natureza do estado T_1 como um estado $n\pi^*$ no caso de FT, 6-OHFT e 7-OHFT. No caso da 3-OHFT e 3,6-OHFT, a ausência de supressão observável permite identificar o estado T_1 como $\pi\pi^*$, uma vez que os tripletos desta natureza não sofrem reacções de abstracção de átomo de hidrogénio.

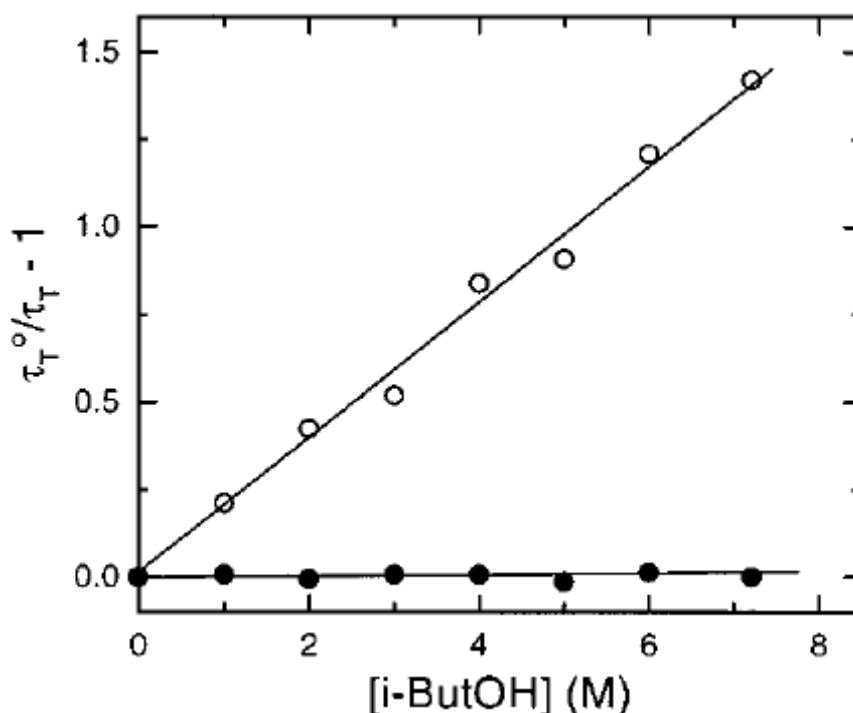


Figura 19 – Supressão dos tempos de vida do tripleto da (○) FT e da (●) 3-OHFT pelo isobutanol em TFEtOH.

Com base no conjunto destes dados, os compostos hidroxílicos podem ser divididos em 3 grupos:

- Grupo I – FT, 6-OHFT e 7-OHFT – têm τ_T mais curtos que 2 μ s em benzeno e são significativamente reduzido em etanol (< 100ns)
- Grupo II – 3-OHFT e 3,6-OHFT – com τ_T maiores que 6 μ s mesmo em etanol
- Grupo III – 5-OHFT e 5,7-OHFT – não mostram ocupação do estado tripleto

5. FOTODEGRADAÇÃO

Foram feitos dois estudos de fotodegradação: em solução e numa matriz sólida (celulose).

5.1 Fotodegradação em solução

Foram realizadas Irradiações de soluções etanólicas ($\sim 1 \times 10^{-4}$ M) dos compostos, na presença e na ausência de oxigénio, utilizando como fonte de irradiação uma lâmpada de arco de média pressão de mercúrio (500 w). A selecção do comprimento de onda de irradiação foi feita usando dois filtros: CS 7-54 *Corning filter* e WG 345 *Schott filter* (linha de $\lambda_{exc} = 366\text{nm}$) para a flavotona e CS 5-60 *Corning filter* e GG 420 *Schott filter* (linha de $\lambda_{exc} = 435\text{nm}$) para a 3-OHFT, 6-OHFT e 3,6-OHFT. A intensidade da luz sob as condições de irradiação foi medida utilizando a actinometria de ferrioxalato: $I_0 = 9 \times 10^{-5}$ einstein $\text{L}^{-1} \text{min}^{-1}$ a 366 nm e $I_0 = 6 \times 10^{-5}$ einstein $\text{L}^{-1} \text{min}^{-1}$ a 435 nm. A variação de concentração dos compostos foi seguida ao longo do tempo de irradiação por espectroscopia de absorção.

5.1.1 Fotodegradação da flavotona em etanol

A figura 20 apresenta o espectro de absorção da flavotona em etanol em função do tempo de irradiação e em presença e na ausência de oxigénio.

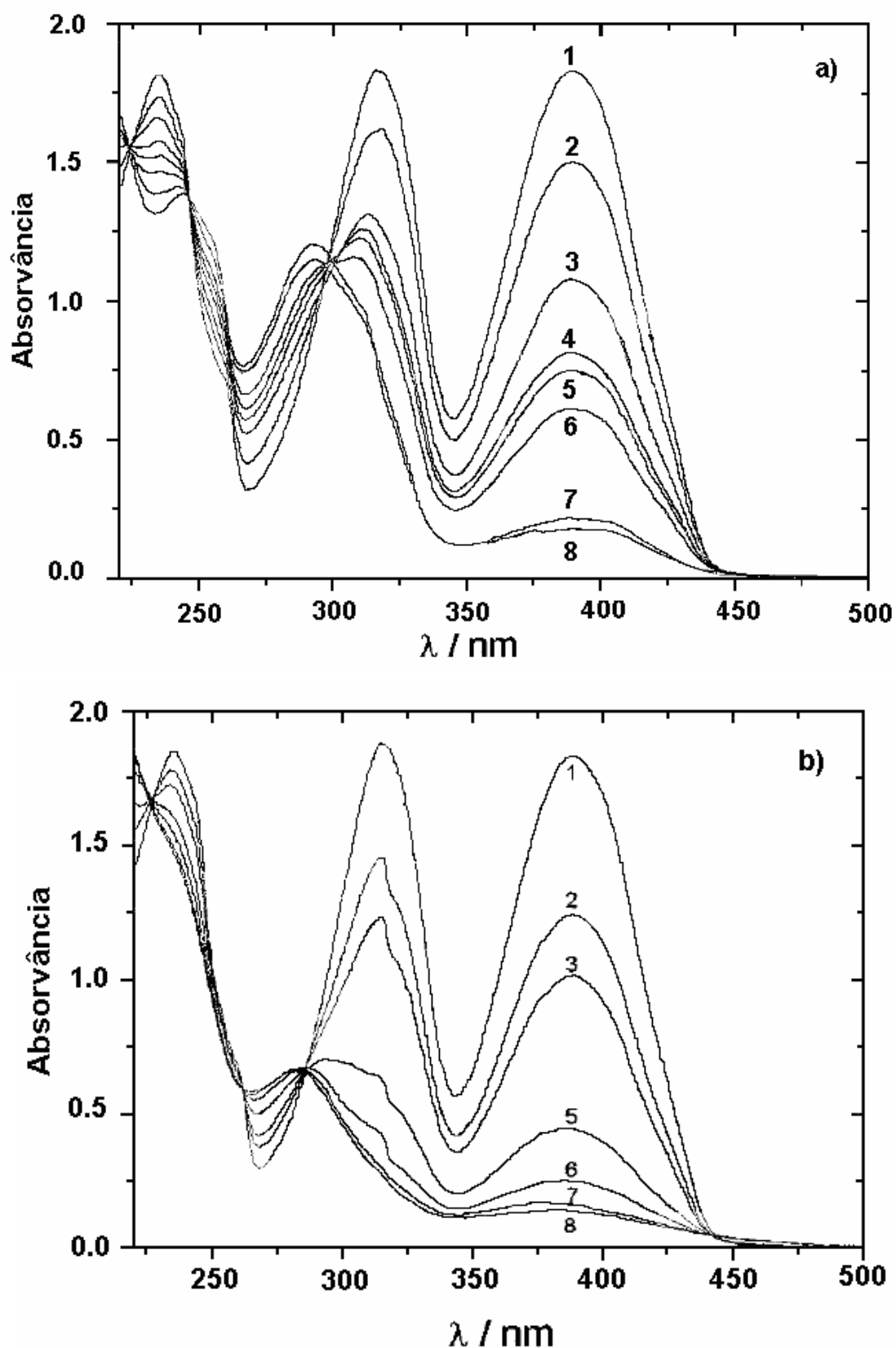


Figura 20 – Fotodegradação da flavotiona em etanol (1×10^{-4} M) em função do tempo de irradiação: a) solução arejada; b) solução desarejada a 20 °C; (1) $t = 0$ min, (2) $t = 1$ min, (3) $t = 2$ min, (4) $t = 3$ min, (5) $t = 4$ min, (6) $t = 5$ min, (7) $t = 10$ min e (8) $t = 15$ min.

Em soluções arejadas (Figura 20a), durante a irradiação, a flavotiona é convertida em flavona (banda 282 nm com um ombro a ~315 nm), enquanto na ausência de oxigénio a flavotiona dá origem a outros fotoprodutos com absorção a ~260 nm (Figura 20b). Os dois principais fotoprodutos da reacção em condições desarejadas, foram isolados por cromatografia em placa e identificados por ^1H e ^{13}C RMN e LC-MS como sendo os seguintes dímeros:

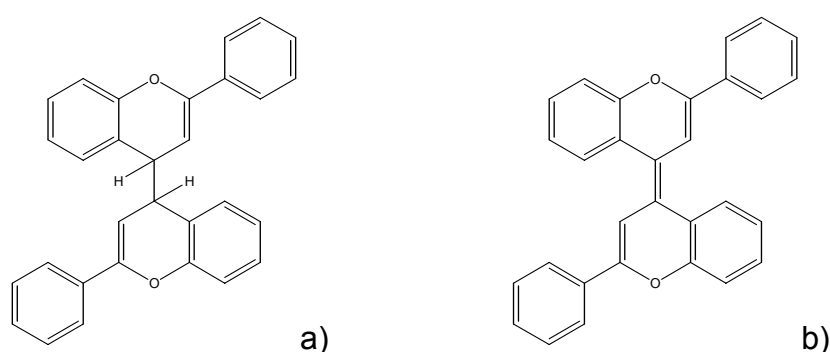


Figura 21 - Principais fotoprodutos da fotodegradação da flavotiona em condições desarejadas.

O isolamento do dímero b é particularmente difícil porque este se decompõe quando exposto ao ar.

Uma observação inesperada foi verificar que o tempo de meia vida da 6-OHFT é maior na presença de oxigénio ($\tau_{1/2} = 23$ min) do que na ausência de oxigénio ($\tau_{1/2} = 5$ min) (tabela 7).

Tabela 7 – Tempos de meia vida ($\tau_{1/2}$) para a fotodegradação da flavotiona, 6-OHFT, 3-OHFT e 3,6-OHFT em soluções arejadas e desarejadas em EtOH a 20 °C.

	Solução	FT ^a	6-OHFT ^a	3-OHFT ^b	3,6-OHFT ^b
$\tau_{1/2}$ (min)	Desarejada	2	5	120	>500
	Arejada	3	23	15	25

^a $I_0 = 9 \times 10^{-5}$ einstein $\text{L}^{-1} \text{min}^{-1}$

^b $I_0 = 6 \times 10^{-5}$ einstein $\text{L}^{-1} \text{min}^{-1}$

Verificou-se ainda que quando a irradiação na ausência de oxigénio é interrompida, em qualquer ponto da reacção, se dá uma reconversão lenta dos produtos em flavotiona (no escuro; Figura 22). A reconversão total demora ~24 h.

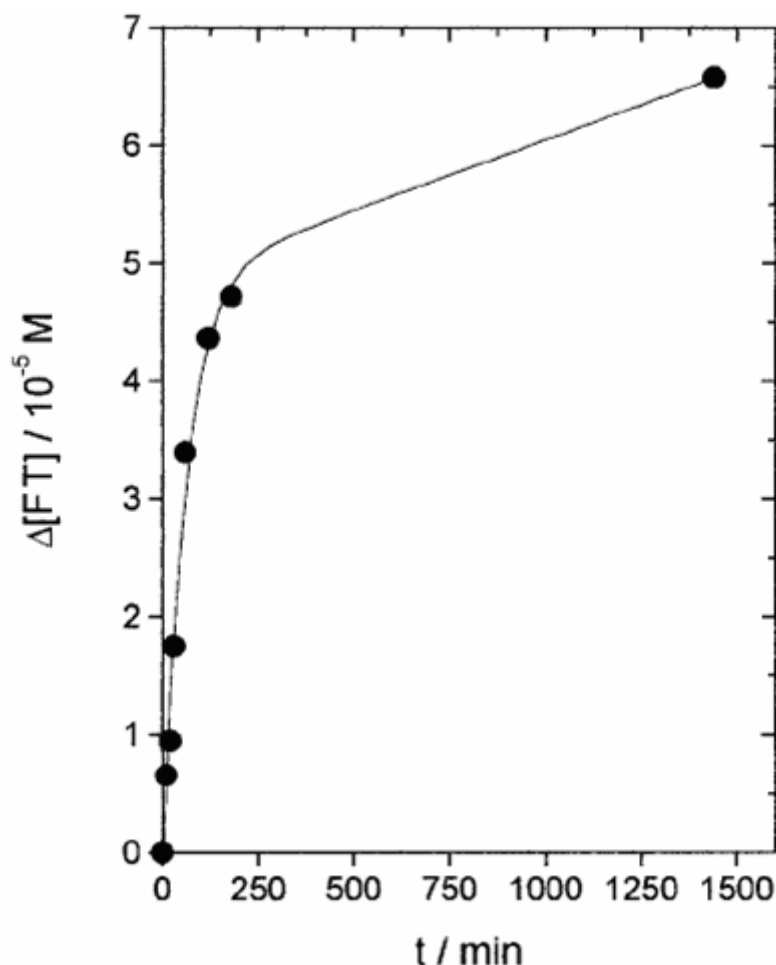


Figura 22 – Aumento da concentração da flavotona em função do tempo, numa solução desarejada em etanol com uma concentração de 1×10^{-3} M, após interrupção da irradiação. Solução mantida no escuro a 20 °C.

5.1.2 Fotodegradação da flavotona em outros alcoois

A fotodegradação da flavotona também foi estudada em TF₂EtOH, MeOH, EtOH e i-PrOH (isopropanol). Na figura 23 apresenta-se a variação da concentração de flavotona em função do tempo de irradiação numa série de álcoois desarejados com diferentes capacidades para doar átomo de hidrogénio. O $\tau_{1/2}$ da fotodegradação diminui com o aumento da capacidade doadora de átomo de hidrogénio (TF₂EtOH < MeOH < EtOH < i-PrOH), o que indica que a abstracção de átomo de H do solvente é o passo limitante na fotoquímica global da flavotona.

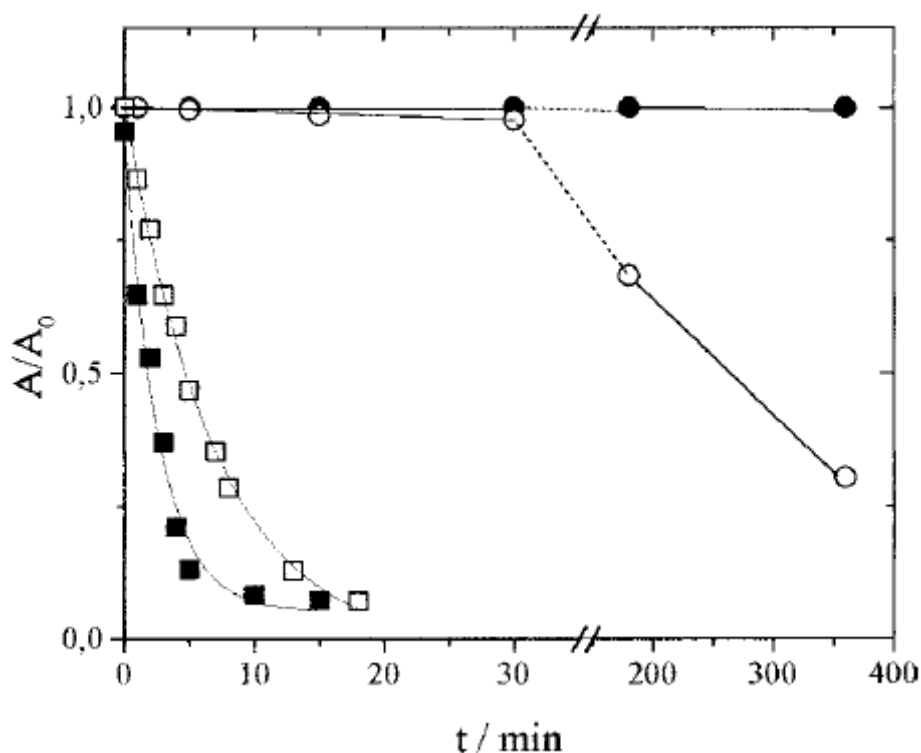


Figura 23 - Fotodegradação da flavotona (absorvância a $\lambda = 390$ nm normalizada a $t = 0$) em função do tempo de irradiação em (■) isopropanol, (□) etanol, (●) trifluoroetanol e (○) metanol, desarejados a 20 °C.

5.1.3 Fotodegradação da 6-OHFT

A irradiação da 6-OHFT, pertencente ao mesmo grupo da FT, deu resultados semelhantes aos obtidos para a FT:

- a) Desaparecimento por conversão em FL parente (6-OHFL) na presença de oxigénio (Figura 24);
- b) Desaparecendo para formar outros produtos que não a 6-OHFL parente na ausência de oxigénio;
- c) Lenta recuperação no escuro na ausência de oxigénio;
- d) Tempos de meia vida de degradação mais longos na presença de oxigénio (tabela 7).

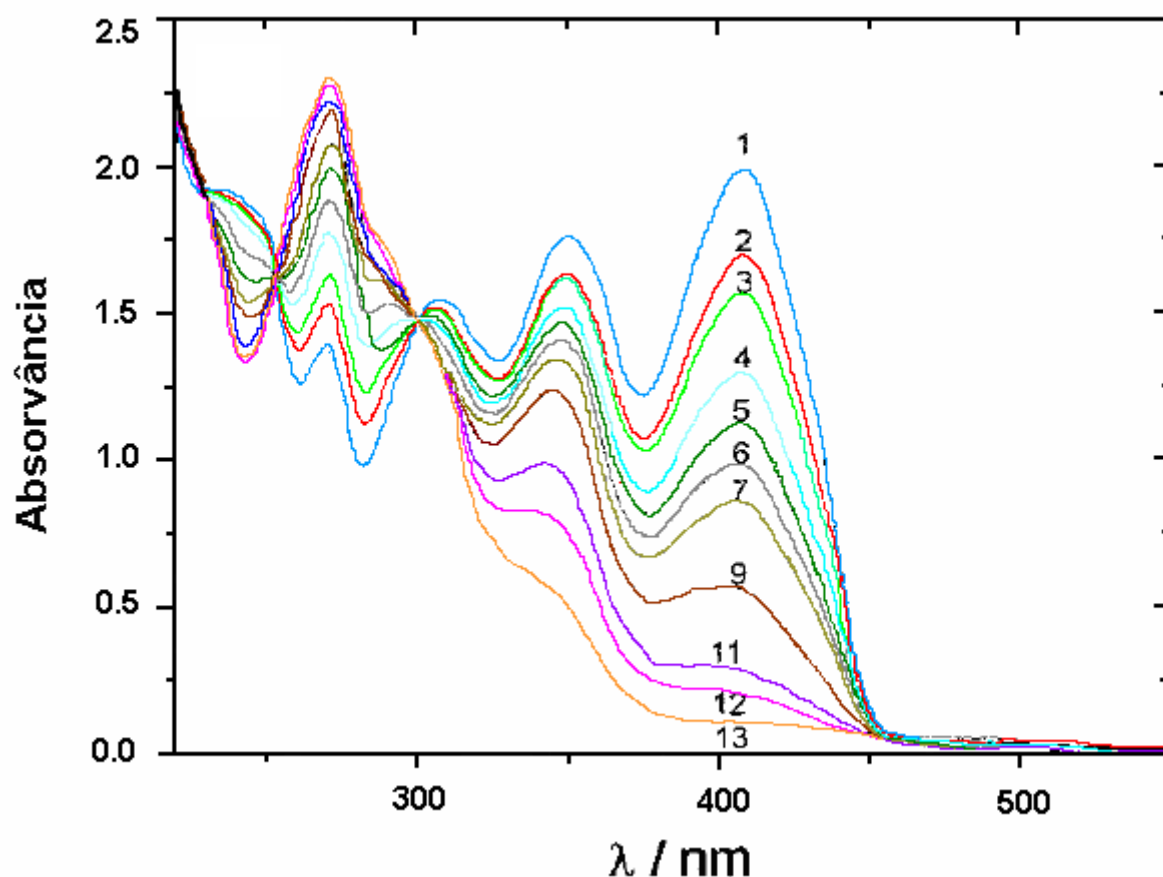


Figura 24 – Irradiação da solução de 6-OHFT em EtOH ($1,14 \times 10^{-4}$ M) na presença de oxigénio e a 20 °C. 1) t = 0 min, 2) t = 5 min, 3) t = 10 min, 4) t = 15 min, 5) t = 20 min, 6) t = 25 min, 7) t = 30 min, 8) t = 35 min, 9) t = 40 min, 10) t = 45 min, 11) t = 50 min, 12) t = 60 min, 13) t = 70 min.

5.1.4 Fotodegradação da 3-OHFT e 3,6-OHFT

As hidroxiflavononas 3-OHFT e 3,6-OHFT (grupo 2) foram irradiadas em solução de etanol na presença e na ausência de oxigénio (Figura 25). Não foi possível identificar a presença da flavona correspondente nem de dímeros, mas os dois compostos foram degradados.

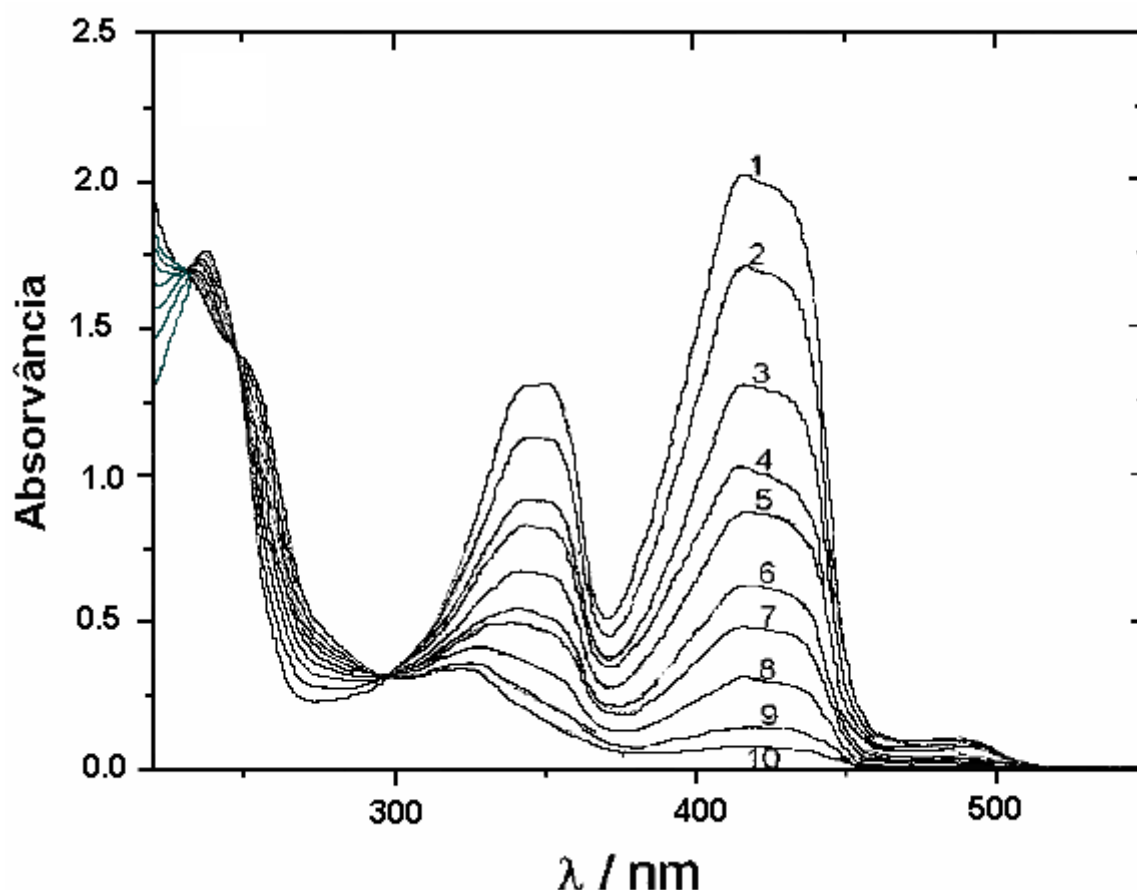


Figura 25 – Irradiação da solução de 3,6-OHFT em EtOH ($1,14 \times 10^{-4}$ M) na presença de oxigénio e a 20 °C: 1) $t = 0$ min, 2) $t = 5$ min, 3) $t = 10$ min, 4) $t = 15$ min, 5) $t = 20$ min, 6) $t = 25$ min, 7) $t = 30$ min, 8) $t = 35$ min, 9) $t = 40$ min, 10) $t = 45$ min, 11) $t = 50$ min, 12) $t = 60$ min, 13) $t = 70$ min.

Isto indica que a abstracção de átomo de H não é uma via eficiente de fotodegradação da 3-OHFT e 3,6-OHFT. A presença de oxigénio diminuiu fortemente o tempo de meia vida do 3-OHFT e 3,6-OHFT, em contraste com o observado no grupo 1 (onde os tempos de meia vida da fotodegradação aumentam na presença de oxigénio). Além do mais em soluções arejadas de MeOH $[O_2] = 2,2 \times 10^{-3}$ M) e i-PrOH $[O_2] = 2,2 \times 10^{-3}$ M¹³, os tempos de meia vida de fotodegradação são aproximadamente os mesmos. Estes resultados indicam fortemente que o oxigénio molecular é o reagente principal na fotodegradação do 3-OHFT e 3,6-OHFT.

O tempo de meia vida da fotodegradação em etanol em soluções desarejadas é cerca de duas ordens de grandeza maior para a 3-OHFT e a 3,6-OHFT do que o observado para a FT e 6-OHFT (tabela 7).

5.1.5 Fotodegradação da 5-OHFT e 5,7-OHFT

Os compostos do grupo 3, 5-OHFT e 5,7-OHFT, foram irradiados na presença e na ausência de oxigénio. Não foi observada fotodegradação após 24 h de irradiação.

5.2 Fotodegradação numa matriz sólida

Os estudos de fotodegradação numa matriz sólida foram realizados de forma a reproduzir as condições ambientais de uma possível aplicação destes compostos como fotopesticidas, incidindo apenas nas flavotionas mais activas: flavotiona, 3-hidroxiflavotiona, 6-hidroxiflavotiona e 3,6-dihidroxiflavotiona. Para tal utilizaram-se placas de celulose (Macherey Nagel MN28B) e soluções saturadas das flavotionas em metanol ou diclorometano, dependendo da solubilidade do composto. As soluções foram aplicadas nas placas de celulose de forma a obter manchas com 6 cm de diâmetro. As placas foram colocadas numa bancada óptica a uma distância de 8 cm da lâmpada de irradiação, e uma tina de vidro com água foi colocada entre a lâmpada e a placa de celulose, para evitar degradação térmica ($T = 25 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$). As placas foram irradiadas de 8 a 24 horas. Após a irradiação, retirou-se uma fatia da mancha de celulose, que foi extraída com um solvente adequado e purificada por cromatografia em placa. A identificação dos fotoprodutos foi realizada tal como anteriormente. Nestas condições o fotoproduto maioritário é sempre a flavona parente: FL > 90 %, 3-OHFL > 80 %, 6-OHFL ~ 100 % e 3,6-OHFL > 90 %.

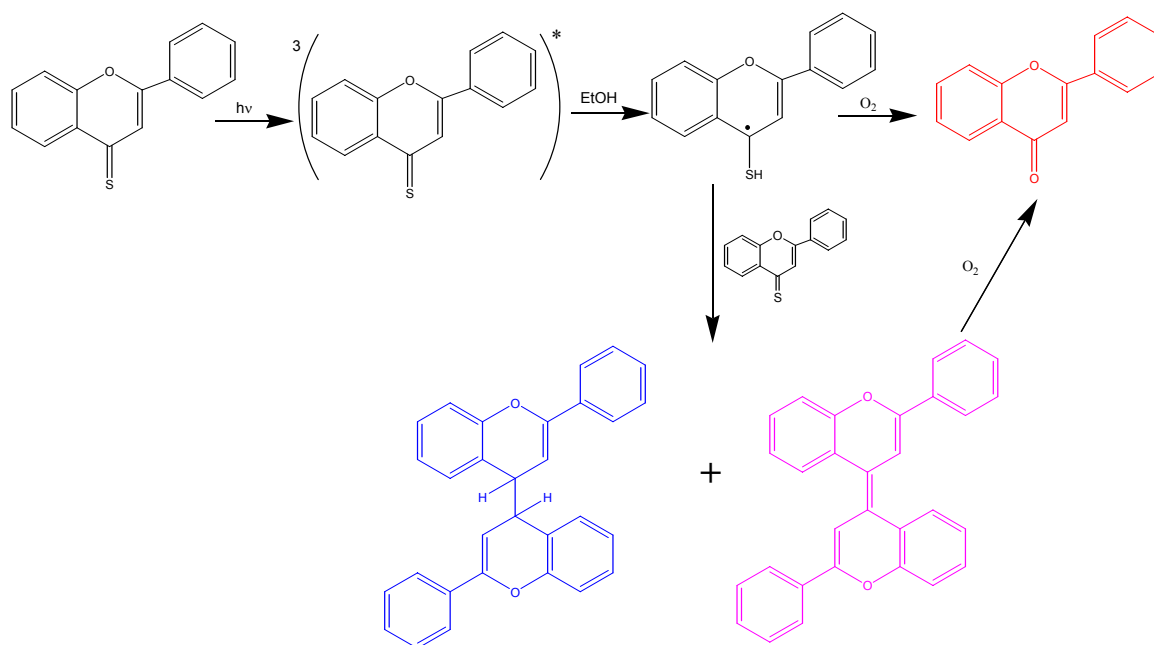


Figura 26 – Mecanismo de fotodegradação da flavotiona na presença e na ausência de oxigénio.

6. CONCLUSÕES

A adição de grupos OH à FT causa vários graus de deslocamento para o vermelho da banda de absorção mais intensa, $S_0 \rightarrow S_2$, sendo o maior deslocamento observado na 3,6-OHFT. A excepção é o 5,7-OHFT. A posição da substituição dos grupos OH adicionados, pode causar grandes diferenças nas propriedades fotofísicas. Estes são causados pela ordem relativa dos estados singletos de menor energia e respectivos estados tripletos, tal como mostra a figura 26.

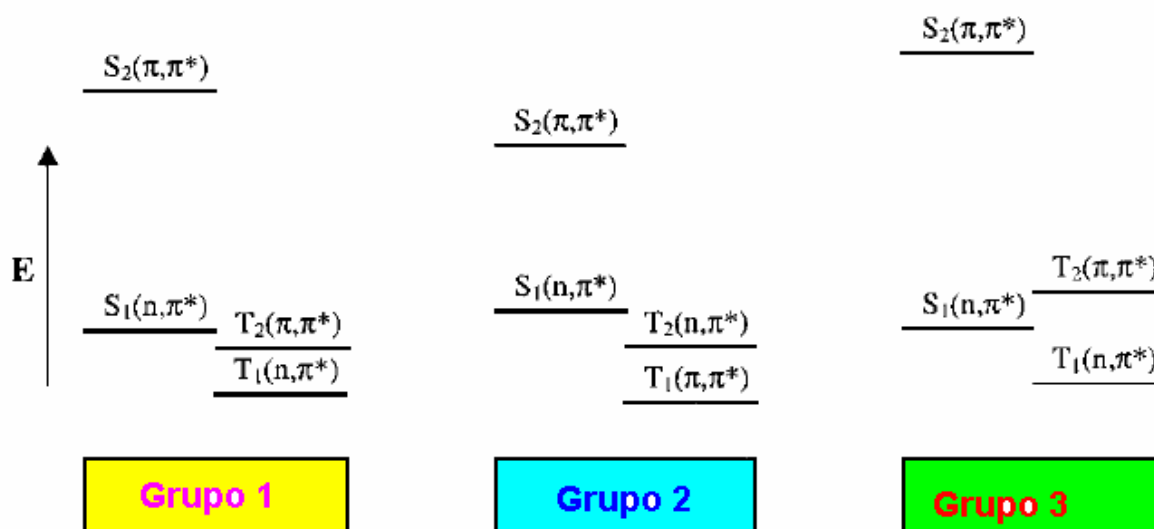


Figura 27 – Diagrama de energia dos dois estados excitados de menor energia, singletos e tripletos, para os compostos dos grupos 1, 2 e 3.

As substituições 6-OH ou 7-OH (grupo I) na FT não mudam a natureza do estado tripleto de menor energia ($n\pi^*$). Em todos os solventes estes compostos têm um elevado rendimento quântico de formação de tripleto, ($\Phi_T = 0,8 - 1$). O Φ_Δ , eficiência de formação de oxigénio singuleto, é de $\sim 0,6$ em benzeno e diminui acentuadamente em etanol, assim como o tempo de vida do tripleto, τ_T . Os dois efeitos devem-se à presença de reacção de abstracção de átomo de H (reacção típica de tripletos $n\pi^*$), que compete com a transferência de energia para o oxigénio.

A substituição em 3-OH ou em 3,6-OH, grupo 2, resulta numa mudança de natureza do tripleto de mais baixa energia, que passa a ser um estado $\pi\pi^*$. Também nestes compostos a formação de tripleto é muito eficiente, $\Phi_T \sim 1$. Neste grupo Φ_Δ é $\sim 0,6$ em todos os solventes, incluindo etanol, o que é explicado pelo facto dos tripletos $\pi\pi^*$ não participarem em reacções de abstracção de átomo de H.

O grupo que contém os compostos 5-OHFT e 5,7-OHFT mostra uma alteração marcante das propriedades fotofísicas comparada com os restantes compostos: não é observada a formação de tripleto e em consequência o Φ_{Δ} é essencialmente zero em todos os solventes (4 solventes). Também não é observada fluorescência ou fosforescência. Os compostos 5-OHFT e o 5,7-OHFT não são bons sensitizadores uma vez que não apresentam ocupação de tripleto.

Os melhores fotosensitizadores para a formação de oxigénio singuleto são os compostos do grupo 2 (3-OH e 3,6-OH). Os compostos do grupo 1 também podem ser fotosensitizadores para a formação de oxigénio singuleto, mas o mecanismo de abstracção de átomo de H pode comprometer esta função, excepto nas situações onde a abstracção do átomo de H for relativamente não competitiva (como em benzeno, acetonitrilo ou talvez em água no meio ambiente).

As propriedades fotofísicas têm reflexo nas propriedades fotoquímicas e nos mecanismos de fotodegradação. A FT e a 6-OHFT abstraem átomo de H do solvente (e.g., etanol) para formar o radical FTH^{*}, que pode reagir com a FT no estado fundamental para formar um dímero ou com o oxigénio molecular para formar a FL parente.

No caso da 3-OHFT e da 3,6-OHFT, temos uma acção típica de fotosensitizadores de oxigénio singuleto. Os resultados indicam que a primeira reacção do oxigénio singuleto com o estado fundamental da FT é responsável pela maior parte da fotoquímica.

Outros compostos, como o 5-OHFT e o 5,7-OHFT são fotoestáveis.

Finalmente a formação de vários produtos para além dos dímeros e da FL parente podem ser observados, apesar de existirem em concentrações baixas. Os resultados podem ser interpretados da seguinte forma: FT com os estados de menor energia $^3n\pi^*$ (grupo 1) são eficientes na abstracção de átomos de H, enquanto os derivados $^3\pi\pi^*$ (grupo 2) não o são e actuam como fotosensitizadores de oxigénio singuleto.

No entanto, excepções ocorrem quando os dois estados singuleto e tripleto de menor energia são $^1n\pi^*$ e $^3n\pi^*$, respectivamente. Neste caso o cruzamento de sistemas ($^1n\pi^* \rightarrow ^3n\pi^*$) não pode competir favoravelmente com a conversão interna para o estado fundamental, o que leva a baixos valores de Φ_T e à ausência de fotoquímica (grupo 3).

A segunda conclusão é que a natureza da fotoquímica das FT pode ser alterada por condições experimentais como a concentração dos reagentes. Exemplos deste facto

são a competição entre o mecanismo de abstracção de H e a fotosensitização do oxigénio ^[25, 26].

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] – Winkel-Shirley, B. "Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology". *Plant Physiology* 126: 485-493, **2001**.
- [2] –Singleton, V. L., in Flavonoids, Childester, C. O., Mrak, E. M., and Stewart, G. F. (eds.), Academic Press, (**1981**), New York, pp. 149–242.
- [3] – Invest Bioméd v.22 n.1 Ciudad de la Habana ene.-Mar. **2003**.
- [4] – Judd, W. S. Campbell, C. S. Kellogg, E. A. Stevens, P.F. Donoghue, M. J. "Secondary Plant Compounds" en: *Plant systematics: a phylogenetic approach, Second Edition*. Sinauer Axxoc, USA. Capítulo 4, **2002**.
- [5] – Yochum, L. *et al.* "Dietary Flavonoid Intake and Risk of Cardiovascular Disease in Postmenopausal Women." *American Journal of Epidemiology* 149:10, **1999**.
- [6] – Balz Frei. "Studies force new view on biology of flavonoids" 5 de marzo del 2007.
- [7] – Winkel-Shirley, B. "It takes a garden. How work on diverse plant species has contribute to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiology* 127: 1399-1404, **2001b**.
- [8] –Bassi, A.B.M.S.; "*Elementos de espectroscopia:Conceitos fundamentais em espectroscopia*", 10/2001, Material Didatico, //www.chemkeys.com, pp. 8, pp.1-8, Campinas, SP, BRASIL, 2001
- [9] – Karplus, M. e Porter, R. N. "Atoms and Molecules - An Introduction for Students of Physical Chemistry", The Benjamin, London, 1970.
- [10] –Valeur, Bernard "Molecular Fluorescence: Principles and Applications" Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001, ISBNs: 3-527-29919-X (Hardcover); 3-527-60024-8 (Electronic).
- [11] – R, S Becker, Sankar Chakravorti, Carlos A. Gartner, *J.Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1993**, 89, 1007-1019.
- [12] – J. B. Hudson, G.H.N. Towers, *Photochem. Photobiol*, **1988**, 48, 289
- [13] – R, S Becker, Sankar Chakravorti, Carlos A. Gartner, *J.Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1993, **89** (7), 1007-1009.
- [14] – Ralph L. Nicholson, Raymond Hammerschmidt, *Annu. Rev. of Phytopathol.* **1992**, 30, 369-389.
- [15] – J. B. Hudson, G.H.N. Towers, *Photochem. Photobiol*, **1988**, 48, 289.
- [16] – G. Porter, R.G.W.Norrish, *Nature* 164, **1949**, 658.

- [17] – Walter J. Moore, 4th edition *Physical Chemistry*, 1970.
- [18] – Zerner, M. C. Semiempirical Molecular Orbital Methods. In *Reviews in Computational Chemistry*, 2; Lipkowitz, K. B., Boyd, D. B., Eds.; VCH Publishers Inc.: New York, **1991**; pp 313-365 and references therein.
- [19] – Carmichael, I.; Hug, G. L. *J. Chem. Phys. Ref. Data* **1986**, 15, 1-204.
- [20] – Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. In *Handbook of Photochemistry*; Marcel Dekker Inc., New York, 1993.
- [21] – Kumar, C. V.; Qin, L.; Das, P. K. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1984**, 80, 783-793.
- [22] – Elisei, F.; Aloisi, G. G., Lattarini, C.; Latterini, L.; Dall'Acqua, F.; Guiotto, A. *Photochem. Photobiol.* **1996**, 64, 67-74.
- [23] – Schmidt, R.; Tanielian, C.; Dunsbach, R.; Wolff, C. *J. Photochem. Photobiol., A* **1994**, 79, 11-17.
- [24] – Turro M., *Molecular photochemistry*, New York, Dover Publications, INC. 1974.
- [25] – Fausto Elisei, João C. Lima, Fausto Ortica, Gian G. Aloisi, Manuela Costa, Emília Leitão, Isabel Abreu, António Dias, Vasco Bonifácio, Jorge Medeiros, António L. Maçanita, Ralph S. Becker, Photophysical Properties of Hydroxy-Substituted Flavothiones *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 6095-6102.
- [26] – António L. Maçanita, Fausto Elisei, Gian Gaetano Aloisi, Fausto Ortica, Vasco Bonifácio, António Dias, Emília Leitão, Maria João Caldeira, Christopher D. Maycock, Ralph S. Becker, Photochemistry of Flavothione and Hydroxyflavothiones: Mechanisms and Kinetics, *Photochemistry and Photobiology*, **2003**, 77(1): 22–29.